



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 9/00</b></p>	<p><b>A2</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/00593</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Januar 2000 (06.01.00)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01859</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1999 (25.06.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 28 850.6      27. Juni 1998 (27.06.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GVS GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND VERWERTUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER PFLANZENSORTEN MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71, D-53115 Bonn (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, D-22609 Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Theodor-Storm-Strasse 34a, D-22926 Ahrensberg (DE). SPERLING, Petra [DE/DE]; Eberhard- strasse 9, D-22041 Hamburg (DE). SCHMIDT, Hermann [DE/DE]; Klaus-Nanne-Strasse 49, D-22457 Hamburg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUER, Wulf; Bayenthalgürtel 15, D-50968 Köln (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, MX, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01859</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1999 (25.06.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 28 850.6      27. Juni 1998 (27.06.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GVS GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND VERWERTUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER PFLANZENSORTEN MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71, D-53115 Bonn (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, D-22609 Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Theodor-Storm-Strasse 34a, D-22926 Ahrensberg (DE). SPERLING, Petra [DE/DE]; Eberhard- strasse 9, D-22041 Hamburg (DE). SCHMIDT, Hermann [DE/DE]; Klaus-Nanne-Strasse 49, D-22457 Hamburg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUER, Wulf; Bayenthalgürtel 15, D-50968 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, MX, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01859</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1999 (25.06.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 28 850.6      27. Juni 1998 (27.06.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GVS GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND VERWERTUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER PFLANZENSORTEN MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71, D-53115 Bonn (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, D-22609 Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Theodor-Storm-Strasse 34a, D-22926 Ahrensberg (DE). SPERLING, Petra [DE/DE]; Eberhard- strasse 9, D-22041 Hamburg (DE). SCHMIDT, Hermann [DE/DE]; Klaus-Nanne-Strasse 49, D-22457 Hamburg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUER, Wulf; Bayenthalgürtel 15, D-50968 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, MX, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: SPHINGOLIPID-DESATURASE</p> <p>(54) Bezeichnung: SPHINGOLIPID-DESATURASE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to enzymes which selectively introduce a double bond in the sphingobase of the ceramide residual of sphingolipids and of capnoids. The invention also relates to DNA sequences which code for these enzymes, to the use of the enzymes and DNA sequences for modifying the content and/or the structure of sphingolipids, the catabolites thereof and/or their synthetic subsequent products in transgenic cells and/or organisms. In addition, a method is provided for producing sphingolipids and capnoids with an unsaturated sphingobase.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Enzyme, die selektiv eine Doppelbindung in die Sphingobase des Ceramidrestes von Sphingolipiden und von Capnoiden einführen und für diese Enzyme kodierende DNA-Sequenzen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Enzyme und DNA-Sequenzen zur Veränderung des Gehaltes und/oder der Struktur von Sphingolipiden, deren Katabolite und/oder deren synthetischer Folgeprodukte in transgenen Zellen und/oder Organismen. Weiterhin wird ein Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden und von Capnoiden mit ungesättigter Sphingobase offenbart.</p>				

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 1 -

**Bezeichnung: Sphingolipid-Desaturase**

Die Erfindung betrifft Enzyme, die selektiv eine Doppelbindung in die Sphingobase des Ceramidrestes von Sphingolipiden und von Capnoiden einführen (nachfolgend auch kurz „Sphingolipid-Desaturase“ oder „Desaturase“ genannt). Die Erfindung betrifft weiterhin für diese Sphingolipid-Desaturasen kodierende DNA-Sequenzen, die Verwendung der Sphingolipid-Desaturasen und der DNA-Sequenzen zur Veränderung des Gehaltes und/oder der Struktur von Sphingolipiden, deren Katabolite und/oder deren synthetischer Folgeprodukte in transgenen Zellen und/oder Organismen sowie ein Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden und von Capnoiden mit ungesättigter Sphingobase (nachfolgend auch „Sphingolipid“) und die so erhaltenen Sphingolipide.

Sphingolipide sind Membrankomponenten, die in allen eukaryoten Zellen und nur in wenigen Bakterien vorkommen. Der hydrophobe Bestandteil, das Ceramid, enthält eine langkettige Base (2-Amino-1,3-dihydroxy-alkan), die über eine Säureamidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verknüpft ist. Anhand der polaren Kopfgruppe unterscheidet man Sphingophosphatide, Sphingoglycolipide, und Sphingophosphoglycolipide. Ein solcher Ceramidrest ist weiterhin in Capnoiden (1-Deoxy-ceramid-1-sulfonsäure) gleitender Bakterien zu finden. Auch dort sind entsprechende Enzyme für die Desaturierung von Capnoiden in gleitenden Bakterien verantwortlich (R. A. Drijber et al., „*Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 contains a structural variant of the sulfonolipid N-acylcapsine“, *Can. J. Microbiol.* **43**: 689-693 1997).

Sphingolipide fungieren als inter- und intrazelluläre Botenstoffe bei Zellwachstum und -differenzierung, bei Apoptosiseffekten und bei der Pathogenabwehr von Mikroorganismen (A. H. Merrill et al., „Sphingolipids: metabolism and cell signalling“, in 'Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes', Vol. 31: 309-339, D. E. Vance und J. E. Vance (Hrsg.), Elsevier Science B. V., Amsterdam (1996)).

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 2 -

Diverse strukturelle Modifikationen des Ceramids sind möglich; jedoch sind nur wenige Gene für dessen enzymatische Variation bislang kloniert worden. So ist es erst Ende 1997 gelungen, die Gene für die delta-4-Hydroxylase der langkettigen Base (D. Haak et al., „Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* Ceramide Requires Sur2p and Scs7p“, *J. Biol. Chem.* **272**: 29704-29710 (1997)) und für die alpha-Hydroxylase der langkettigen Fettsäure (A. G. Mitchell et al., „Fah1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome b<sub>5</sub> Fusion Protein, and Its *Arabidopsis thaliana* Homolog that Lacks the Cytochrome b<sub>5</sub> Domain Both Function in the  $\alpha$ -hydroxylation of Sphingolipid-associated Very Long Chain Fatty Acids“, *J. Biol. Chem.* **272**: 28281-28288 (1997)) zu identifizieren. Es ist jedoch noch kein Gen oder DNA-Sequenz bekannt, das bzw. die für eine Sphingolipid-Desaturase kodiert.

Zwar sind eine Reihe von Enzymen und Nukleinsäuren bekannt, deren Aminosäuresequenzen bzw. DNA-Sequenzen eine gewisse Ähnlichkeit mit den erfindungsgemäßen Sequenzen besitzen. Es handelt es sich jedoch hierbei entweder a) um stereoselektive Glycerolipid-Desaturasen bzw. um für solche Glycerolipid-Desaturasen kodierende DNA-Sequenzen, die eine *cis*-Doppelbindung in Acylreste einführen (J. Shanklin et al., „Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase“, *Biochemistry* **33**: 12787-12794 (1994); O. Sayanova et al., „Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b<sub>5</sub> domain results in the accumulation of high levels of  $\Delta^6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4211-4216 (1997); und WO 96/21022) und nicht um Sphingolipid-Desaturasen, oder b) um DNA-Sequenzen bei denen die enzymatische Funktion des davon kodierten Proteins unbekannt ist (P. Sperling et al., „A cytochrome-b<sub>5</sub>-containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases“, *Eur. J. Biochem.* **232**: 798-805 (1995)). Weiterhin sind DNA-Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* als EST-Klone in Genbanken veröffentlicht (EMBL Accession Numbers: T42569, N37558, F13728, T42806 und F13717).

Sphingolipide sind komplexe Naturstoffe mit hoher Heterogenität, die in Pflanzen, Tieren, Insekten, Pilzen und einigen Bakterien gefunden werden. Eine preiswerte

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 3 -

Herstellung homogener Verbindungen im großtechnischen Maßstab war bislang nicht möglich, da entsprechende Gene noch nicht kloniert waren. Seit gefunden wurde, daß Sphingolipide als ein wesentlicher Bestandteil der epidermalen Lipide eine entscheidene Rolle bei der Stabilisierung der Barrierefunktionen der Haut spielen, werden sie inzwischen weitverbreitet in der Kosmetik eingesetzt. Da natürliche Sphingolipide durch aufwendige Verfahren extrahiert und gereinigt werden müssen, sind sie allerdings sehr teuer, so daß es nicht an Bemühungen fehlt, sogar analoge Strukturen zu suchen, die sich aus preisgünstigen Edukten leicht synthetisieren lassen (H. Möller et al., „Neue Pseudoceramide durch Verknüpfung von speziellen Fettstoffen mit Kohlenhydrat-Derivaten“, Abstract und Kurzreferat präsentiert auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. (DGF) 'Innovation durch Kombination: Fette-Kohlenhydrate-Proteine', Bremen, 7. Okt. 1996).

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, zur biochemischen Synthese von ungesättigten Sphingolipiden bzw. für die Modifikation von Sphingolipiden benötigte Enzyme zur Verfügung zu stellen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß gewisse aus den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* isolierte cDNA-Sequenzen für Sphingolipid-Desaturasen kodieren, mit denen Sphingolipide mit unterschiedlicher Regio- und Stereoisomerie der Doppelbindung in der Sphingobase zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft somit (1) Sphingolipid-Desaturasen die selektiv eine Doppelbindung in die Sphingobase des Ceramidrestes von Sphingolipiden und von Capnoiden einführen. Die erfindungsgemäße Sphingolipid-Desaturase führen bevorzugt eine  $\Delta$ -6 Doppelbindung in die Sphingobase ein. Unter „ $\Delta$ -6“ ist in der vorliegenden Anmeldung die relative Position der eingeführten Doppelbindung zu verstehen (eine Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> nach dem letzten sauerstoffaktivierten C-Atom (C<sub>1</sub>); siehe Figur 14). Daneben wird mit „delta-4“, „delta-8“, „delta-9“ und „delta-10“ im nachfolgenden die absolute Position der Doppelbindung bezeichnet.

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 4 -

Das erfindungsgemäße Enzym unterscheidet sich von den o.g. Glycerolipid-Desaturasen hinsichtlich seiner Substratspezifität (langkettige Base der Sphingolipide), seiner Regioselektivität (Position der eingeführten Doppelbindung delta-8 bei Pflanzen bzw. delta-8 und delta-9 in transgener Hefe) und seiner Stereoselektivität (*cis* und *trans*).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Aminosäuresequenz eine oder mehrere der Fragmente a) - c) oder c) - e), wobei solche Sphingolipid-Desaturasen besonders bevorzugt sind, deren Aminosäuresequenz alle drei Fragmente a) - c) oder c) - e) umfaßt:

- a) HDAGH,
- b) HN[A,S]HH (d. h. HNAHH oder HNSHH);
- c) QLEHH;
- d) AYY<sub>a</sub>X<sub>b</sub>HD[A,S]GH, wobei X<sub>a</sub> und X<sub>b</sub> beliebige Aminosäurereste sind, und
- e) THNAHH.

Das Fragment d) weist vorzugsweise die Sequenz AYY<sub>a</sub>GHDAGH auf, wobei X<sub>a</sub> ein beliebiger Aminosäurerest ist. Neben den Fragmenten a) - e) können die erfindungsgemäßen Desaturasen auch noch die Fragmente AWWKWT und/oder FGGLQF enthalten.

Die erfindungsgemäßen Desaturasen umfassen dabei nicht eine Desaturase mit der in Fig. 15 gezeigten Aminosäuresequenz. Besonders bevorzugte Sphingolipid-Desaturasen der vorliegenden Erfindung umfassen die in Fig. 2 oder 4 gezeigte Aminosäuresequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin (2) DNA-Sequenzen, die für die vorstehenden in (1) definierten Desaturasen kodieren, wobei die in Fig. 15 gezeigte DNA-Sequenz nicht mit eingeschlossen ist. Die DNA-Sequenz ist dabei bevorzugt aus *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* erhältlich, wobei DNA-Sequenzen, die die in Fig. 1 oder 3 gezeigten Sequenzen umfassen, besonders bevorzugt sind.

Weiterhin werden (3) Vektoren, die die in (2) definierte DNA-Sequenzen umfassen, offenbart. Die erfindungsgemäßen Vektoren können zusätzlich zu den DNA-

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 5 -

Sequenzen noch die Expression dieser DNA-Sequenzen fördernde funktionelle DNA-Sequenzen wie z. B. Promotoren, ein Terminationssignal und/oder Sekretionssequenzen enthalten, die mit den DNA-Sequenzen (2) funktionell verknüpft sind.

Weiterhin betrifft die Erfindung

(4) Zellen, die mit einem der in (3) definierten Vektoren transformiert sind, wobei diese Zellen vorzugsweise Pflanzen-, Pilz-, Bakterien- oder Tierzellen sind;

(5) transgene Organismen, die

a) eine DNA-Sequenz, wie vorstehend unter (2) definiert, umfassen

b) einen Vektor, wie vorstehend unter (3) definiert, umfassen und/oder

c) aus einer Zelle, wie vorstehend unter (4) definiert, generierbar sind;

(6) Pflanzen oder deren Nachkommenschaft, die aus der Pflanzenzelle, wie vorstehend unter (5) definiert, generierbar sind, wobei die Pflanzen bevorzugt Nutzpflanzen sind und/oder ein verändertes delta-8-Basenmuster aufweisen; und

(7) ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen die einen erhöhten oder reduzierten Anteil oder ein verändertes cis/trans-Verhältnis an delta-8-ungesättigten langkettigen Basen aufweist, umfassend

a) die Transformation einer Pflanzenzelle mit einer DNA-Sequenz, wie vorstehend unter (2) definiert, einschließlich der DNA Sequenzen aus Fig. 15, und

b) die Regeneration einer Pflanze mit verändertem delta-8-Basenmuster in ihren Sphingolipiden.

Das Verfahren gemäß (7) ist dabei

a) zum Kompensieren eines Mangels an delta-8-ungesättigten langkettigen Basen in einem Organismus

b) zum Ausschalten der Produktion an delta-8-ungesättigten Basen,

c) zur Herstellung von Pflanzen mit verbesserter Toleranz und Resistenz gegenüber Bodenversalzung und/oder Ionenstress bzw. -toxizität und /oder Trockenheit und/oder Feuchte und /oder Kälte bzw. Frost und pflanzenpathogenen Mikroorganismen und

d) zur Herstellung von Pflanzen mit geändertem Größenwachstum und Blütezeit geeignet.

WO 00/00593

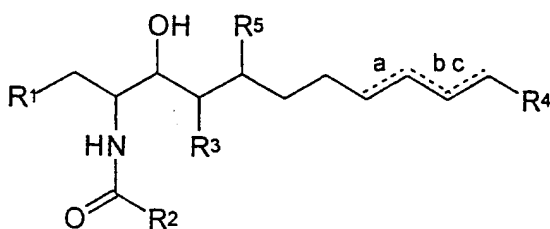
PCT/DE99/01859

- 6 -

Zur Herstellung transgener Pflanzen mit einem stark reduziertem Gehalt an delta-8-ungesättigten langkettigen Basen in ihren Sphingolipiden kann z. B. das o.g. Gen aus *A. thaliana* in antisense-Orientierung und das o.g. Gen aus *B. napus* in sense-Orientierung (Co-Suppression) in einen konstitutiven Pflanzen-Expressionsvektor kloniert werden. Die Transformation von *A. thaliana* erfolgt dann z. B. mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten *in planta* Vakuum-Infiltration (N. Bechthold et al., „In Planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants“, *C. R. Acad. Sci., Paris, Life Science* **316**: 1194-1199 (1993); A. F. Bent et al., „RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes“, *Science* **265**: 1856-1860 (1994)). Die erfolgreiche Suppression der delta-8-Sphingolipid-Desaturierung kann in den transgenen Pflanzen durch die Analyse der langkettigen Basen, die aus den Sphingolipiden isoliert werden, nachgewiesen werden.

Weiterhin betrifft die Erfindung

(8) ein Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden und von Capnoiden mit ungesättigten Sphingobase, umfassend das Kultivieren von Zellen, Organismen oder Pflanzen, wie vorstehend unter (4) - (6) definiert. Das Verfahren umfaßt weiterhin die Isolierung der Sphingolipide aus der Kultur. Das hergestellte Sphingolipid ist dabei vorzugsweise eine Verbindung mit der Formel (I)



(I),

worin

$R^1$  -OH, -OPO<sub>3</sub>HR<sup>6</sup>, ein Kohlenhydratrest oder -SO<sub>3</sub>H ist;

$R^2$  ein C<sub>1</sub>-C<sub>33</sub>-Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Hydroxylresten substituiert sein kann;

$R^3$  und  $R^5$  unabhängig voneinander -H oder -OH sind, oder  $R^3$  und  $R^5$  zusammen eine trans-Doppelbindung bilden;



WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 7 -

$R^4$  -H oder ein  $C_1$ - $C_{15}$ -Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Methylresten substituiert sein kann;

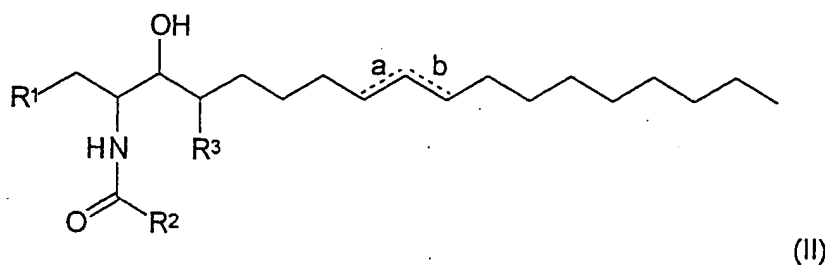
$R^6$  -H, ein Polyhydroxyalkylrest, ein Aminoalkylrest oder ein Kohlenhydratrest ist;

und entweder a, b oder c eine Doppelbindung ist, wobei,

(a) wenn  $R^3$  und  $R^5$  -H sind, a eine Doppelbindung ist, und

(b) wenn  $R^3$  -OH ist und  $R^5$  -H ist, a oder b eine Doppelbindung ist.

In den hergestellten Sphingolipiden ist vorzugsweise  $R^2$  ein  $C_{10}$ - $C_{24}$ -Alkylrest und  $R^4$  ein  $C_3$ - $C_{12}$ -Alkylrest, insbesondere ein  $C_7$ -,  $C_9$ - oder  $C_{11}$ -Alkylrest. Ein Kohlenhydratrest im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer oder mehreren glycosidisch verknüpften Aldopentosen, Aldohexosen, Keto hexosen sowie den daraus abgeleiteten Amino-, Uron- und Desoxyderivaten. Unter Polyhydroxyverbindungen sind von Alkanpolyolen wie Glycol, Glycerin und Mannit abgeleitete Reste zu verstehen. Aminoalkylreste im Sinne der vorliegenden Erfindung sind 2-Aminoethyl- und 2-(Trimethylammonium)alkylreste. Insbesondere ist das hergestellte Sphingolipid eine Verbindung mit der Formel (II)



worin  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , a und b die oben angegebene Bedeutung aufweisen.

Bei der erfindungsgemäßen Klonierung und Expression des für eine Sphingolipid-Desaturase codierenden Gens *sld1* aus cDNA der Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* in der Hefe *Saccharomyces* konnten neuartiger Produkte in den transgenen Hefen nachgewiesen werden, deren chemische Struktur eindeutig identifiziert wurde. Es handelt sich um verschiedene Sphingolipide deren Spingobasen unterschiedliche Regio- und Stereoisomerie der Doppelbindung aufweisen:

WO 00/00593

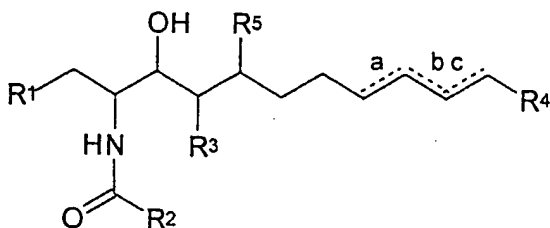
PCT/DE99/01859

- 8 -

- (i) D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(8Z)-octadecen (t18:1<sup>8c</sup>)
- (ii) D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(8E)-octadecen (t18:1<sup>8t</sup>)
- (iii) D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(9Z)-octadecen (t18:1<sup>9c</sup>)
- (iv) D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(9E)-octadecen (t18:1<sup>9t</sup>)

Überraschenderweise wurden in den transgenen Hefen nicht nur die pflanzentypischen delta-8 Stereoisomere (i) und (ii), wie sie z. B. aus H. Imai et al., „Sphingoid Base Composition of Cerebrosides from Plant Leaves“, *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 351-353 (1997), bekannt sind, sondern auch das in der Natur nicht vorkommende delta-9 Regioisomer (iii) und (iv) des Phytosphingens gebildet.

Die Erfindung betrifft somit auch (9) Spingobasen und Capnoide mit ungesättigter Spingobase mit der Formel



(I),

worin

R<sup>1</sup> -OH, -OPO<sub>3</sub>HR<sup>6</sup>, ein Kohlenhydratrest oder -SO<sub>3</sub>H ist;

R<sup>2</sup> ein C<sub>1</sub>-C<sub>33</sub>-Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Hydroxylresten substituiert sein kann;

R<sup>3</sup> und R<sup>5</sup> unabhängig voneinander -H oder -OH sind, oder R<sup>3</sup> und R<sup>5</sup> zusammen eine trans-Doppelbindung bilden;

R<sup>4</sup> -H oder ein C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Methylresten substituiert sein kann;

R<sup>6</sup> -H, ein Polyhydroxyalkylrest, ein Aminoalkylrest oder ein Kohlenhydratrest ist;

und entweder a, b oder c eine Doppelbindung ist, wobei,

(a) wenn R<sup>3</sup> und R<sup>5</sup> -H sind, a eine Doppelbindung ist,

WO 00/00593

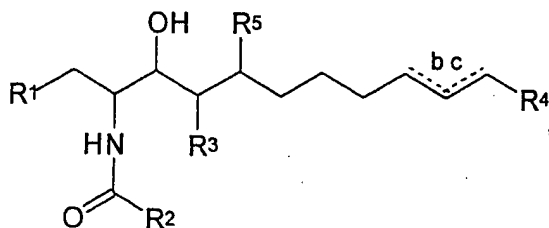
PCT/DE99/01859

- 9 -

(b) wenn  $R^3$  -OH ist und  $R^5$  -H ist, a oder b eine Doppelbindung ist, und  
 (b) wenn  $R^4$  ein  $C_7$ -,  $C_9$ - oder  $C_{11}$ -Alkylrest ist, a keine Doppelbindung ist, und Derivate derselben.

Bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend unter (8) erwähnt. Unter „Derivate“ sind Produkte aus chemischen oder enzymatischen Umsetzungen zu verstehen, wobei durch diese Umsetzung das Molgewicht der Sphingobase sowohl erhöht (z. B. durch O-Acylierung und Hydroxylierung von Doppelbindungen) als auch durch Spaltungsreaktionen verringert sein kann (z. B. durch Abspaltung des Fettsäurerests des Ceramidrests). Unter „Derivat“ ist somit auch die freie Sphingobase zu verstehen.

Bevorzugt Sphingolipide sind solche mit der nachfolgenden Formel:



(III),

wobei  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , b und c die oben angegebene Bedeutung haben.

Schließlich betrifft die Erfindung (10) Kosmetika, Arznei- oder Nahrungsmittel oder chemische Rohstoffe, die eine Verbindung, wie gemäß dem Verfahren (8) hergestellt oder wie in (9) definiert, umfassen. Unter Arzneimittel sind dabei Mittel zur Regulation des Blutdrucks und Herzrhythmus, zur Modulation der Insulinsekretion, Mittel zur Wundheilung, Mittel mit Anti-Tumor-Aktivität, Schutzwirkung gegen Radioaktivität, Stimulation des Zellwachstums, Beeinflussung der Leukozytendifferenzierung, Immunrezeptoren für Viren, bakterielle und Mycotoxine. Die zahlreichen humanen Sphingolipid-Speicherkrankheiten, wie z. B. Niemann-Pick- und Tay-Sachs-Disease, legen ebenfalls eine Anwendung als therapeutisch

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 10 -

wirksame Feinchemikalie beim Menschen nahe, mit einem hohen pharmacologischen, toxicologischen und Ernährungspotential.

Weitere Möglichkeiten diese Substanzen wirtschaftlich zu nutzen bestehen darin, deren Gehalt und/oder Zusammensetzung in bestimmten Organismen zu manipulieren und damit ökonomisch relevante Eigenschaften dieser Organismen positiv zu verändern. Marktchancen sehen wir im Bereich von Veränderungen hinsichtlich des Wachstumsverhalten (Längenzuwachs und Blattspreitengröße) sowie der Beeinflussung des Blühbeginns bei transgenen Nutzpflanzen. Durch eine heterologe Expression und/oder homologe Überexpression und/oder antisense-Ausschaltung der Sphingolipid-Desaturase Gene könnten Kulturpflanzen mit verbesserter Toleranz oder Resistenz 1.) gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie Bodenversalzung, Ionenstress und -toxizität, Trockenheit, Feuchte und Kälte/Frost (M. Uemura et al., „Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana*“, *Plant Physiol.* **109**: 15-30 (1995) bzw. 2.) gegenüber pflanzenpathogenen Mikroorganismen (z.B. Pilzresistenz) erzeugt werden. Die meisten kühlresistenten Pflanzen zeichnen sich durch einen höheren Anteil an delta-8-cis-Phytosphingenin aus (H. Imai et al., s. o.). Weiterhin ist gezeigt worden, daß pflanzliche und pilzeigene Cerebroside mit delta-8-ungesättigten langkettigen Basen die Fruchtkörperbildung von Pilzen induzieren bzw. steigern können (Kawai et al., „Stimulatory effect of certain plant sphingolipids on fruiting of *Schizophyllum commune*“, *J. Biol. Chem.* **261**: 779-784 (1986)).

Durch eine Antisense-Ausschaltung des entsprechenden  $\Delta 6$ -Sphingolipid-Desaturasegens in Mikroorganismen, wie z. B. Hefen und Pilze, könnte deren Phyto- und/oder Humanpathogenität vermindert werden. Durch eine heterologe Expression der pflanzlichen Sphingolipid-Desaturase in Mikroorganismen wie z. B. Bäcker-, Brauhefe und deren Mutanten (R. C. Dickson et al., „Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids“, *Mol. Cell Biol.* **10**: 2176-2181 (1990); W. J. Pinto et al., „Characterization of Enzymatic Synthesis of Sphingolipid Long-Chain Bases in *Saccharomyces cerevisiae*: Mutant Strains Exhibiting Long-Chain-Base Auxotrophy Are Deficient in Serine palmitoyltransferase Activity“, *J. Bacteriol.* **174**: 2575-2581 (1992)) könnten diese in ihren

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 11 -

Wachstumseigenschaften, z. B. Temperaturtoleranz, verbessert werden und als Bioreaktoren für natürliche und artifizielle Spingolipide und deren Folgeprodukte dienen.

Eine Expression der pflanzlichen Sphingolipid-Desaturase kann auch in Prokaryoten zu modifizierten Sulfonolipiden und Folgeprodukten führen, die einerseits deren Beweglichkeit verändern und andererseits als neue chemische Verbindungen wirtschaftlich interessant sein könnten.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

### Figurenbeschreibung

Fig. 1: Nukleotidsequenz (1594 bp) der Sphingolipid-Desaturase (*sld1*) aus *Brassica napus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und offenem Leseraster.

Fig. 2: Deduzierte Aminosäuresequenz (449 aa) der Sphingolipid-Desaturase aus *B. napus*.

Fig. 3: Nukleotidsequenz (1678 bp) der Sphingolipid-Desaturase (*sld1*) aus *Arabidopsis thaliana* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und offenem Leseraster.

Fig. 4: Deduzierte Aminosäuresequenz (449 aa) der Sphingolipid-Desaturase aus *A. thaliana*.

Fig. 5: Proteinsequenzvergleiche der Sphingolipid-Desaturasen aus *B. napus* (BnDES8, Fig. 2), *A. thaliana* (AtDES8, Fig. 4) und Sonnenblume (HaDES?, (Sperling et al., 1995), Fig. 15) mit der delta-6 Glycerolipid-Desaturase aus Borretsch (BoDES6 (Sayanova et al., 1997)). Die N-terminale Domäne bis Position 121 der Sonnenblumensequenz ist mit dem hydrophilen Teil von Cytochrome b<sub>5</sub> homolog, dessen konservierte Aminosäuren unterstrichen sind. Die drei hoch konservierten Histidinboxen (Shanklin et al., 1994), die charakteristisch für Lipid-Desaturasen sind,

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 12 -

sind eingezeichnet. Identische Aminosäuren sind durch graue Schattierung hervorgehoben.

Fig. 6: Vektorkonstrukt zur Expression des *sld1*-Gens aus *B. napus* (pYES2Bn) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 7: Vektorkonstrukt zur Expression des *sld1*-Gens aus *A. thaliana* (pYES2At) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 8: Bildung von Phytosphingeninen in Hefezellen durch heterologe Expression pflanzlicher Sphingolipid-Desaturasen. Die langkettigen Basen (LCB) der Sphingolipide wurden aus ganzen Zellen durch starke alkalische Hydrolyse (Morrison und Hay, 1970) gewonnen, in ihre Dinitrophenyl-Derivate (Karlsson, 1970) überführt und mittels RP-HPLC analysiert. (A) Trennung der Referenzsubstanzen (Sigma) Phytosphinginin (t18:0), 4-*trans*-Sphingenin (d18:1) und Sphinganine (d18:0). (B) LCB-Muster der Wildtyp-Hefezellen (INVSc1) bzw. transformiert mit dem Leervektor pYES2. Bildung von *cis*- und *trans*-Phytosphingenin (t18:1) in Hefezellen, die entweder (C) das *A.thaliana* Fusionsprotein (pYES2At) oder (D) das *B. napus* Fusionsprotein (pYES2Bn) exprimieren. (E) LCB-Muster von *A. thaliana* (Wildtyp) - Pflanzen.

Fig. 9: GC-MS Elutionsprofil von Fettsäuremethylestern, die durch KMnO<sub>4</sub>-Oxidation eines ungesättigten Phytosphinginin-Isomerengemischs erhalten werden (Beispiel 5).

Fig. 10: Partielle <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (600 MHz) von (A) *trans*-Δ<sup>8,9</sup>- und (B) *cis*-Δ<sup>8,9</sup>-Phytosphingenin. Die Zuordnung der Signale erfolgte mittels COSY Experimenten.

Fig. 11: Vektorkonstrukt zur heterologen Überexpression in Sense-Orientierung des *sld1*-Gens aus *B. napus* (pBIB5Bn) in *A. thaliana*.

Fig. 12: Vektorkonstrukt zur homologen Antisense-Suppression des *sld1*-Gens aus *A. thaliana* (pBIB5At) in *A. thaliana*.

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 13 -

Fig. 13: Suppression der delta-8-Sphingolipid-Desaturierung in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen. Die langkettigen Basen (LCB) der Sphingolipide wurden aus Mischproben (350 mg Frischgewicht) ganzer T2-Pflanzen, 34 d nach Keimung, durch starke alkalische Hydrolyse (Morrison und Hay, 1970) gewonnen, in ihre Dinitrophenyl-Derivate (Karlsson, 1970) überführt und mittels RP-HPLC analysiert. (A) Trennung der Referenzsubstanzen (Sigma) Phytosphinginin (t18:0), 4-*trans*-Sphinginin (d18:1) und Sphinganine (d18:0). (B) LBC-Muster der Wildtyp-Pflanzen bzw. transformiert mit dem Leervektor pBI121. Reduktion von *cis*- und *trans*- $\Delta$ 8-Phytosphinginin (t18:1) in T2-Pflanzen (C) durch homologe Antisense-Expression des *sld1*-Gens aus *A. thaliana* (pBIB5At) und (D) durch heterologe Sense-Expression (Co-Suppression) des *sld1*-Gens aus *B. napus* (pBIB5Bn).

Fig. 14: Regioselektivität der pflanzlichen Sphingolipid-Desaturase. Die  $\Delta$ 6-Sphingolipid-Desaturasen führen eine delta-8- und -9-Doppelbindung in *cis*- und *trans*-Konfiguration in langkettige Basen ein, was zur Bildung von Phytosphinginin bzw. phytosphingininhaltiger Sphingolipide (t18:1) in den transformierten Hefezellen führt (R repräsentiert eine Vielzahl möglicher Fettsäurereste).

Fig. 15: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz aus P. Sperling et al. (1995), s. o.

Fig. 16: Erweiterter Proteinsequenzvergleich von Sphingolipid-Desaturasen (die oberen 5 Sequenzen) mit  $\Delta$ 6-Fettsäuredesaturasen (BnDES8, AtDES8, HaDES? Und BoDES6 s. Fig. 5; d51pu, b51bo und d52pu sind unveröffentlichte Teilsequenzen der Anmelderin; b5cae, 2b5ce und b5pp haben die EMBC Accession Numbers Z70271, Z81122 und AJ222980).

## Beispiele

Nachfolgend werden folgende Abkürzungen verwendet:

cDNA      copy-Desoxyribonukleinsäure

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 14 -

FAME	Fettsäuremethylester
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
LCB	langkettige Basen (der Sphingolipide)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NMR	'Nuclear Magnetic Resonance' Spektroskopie
PCR	Polymerasekettenreaktion
TLC	Dünnschichtchromatographie

#### Beispiel 1: Isolierung und Klonierung von *sld1* aus *B.napus*

Restriktionsendonukleasen und DNA modifizierende Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben von den Firmen New England Biolabs und Boehringer Mannheim bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. *E. coli* XL1 blue, MRF' (Stratagene) wurde bei 37 °C in LB-Medium (J. Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989)) angezogen. Für die Selektion von mit Plasmiden transformierten *E. colis* wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml) dem Medium zugesetzt. Die Transformation kompetenter *E. coli* erfolgte nach H. Inoue et al., „High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids“, *Gene* 96: 23-28(1990) und die DNA-Minipräparation nach M. G. Riggs et al., „A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation“, *BioTechniques* 4: 310-313 (1986).

Um eine homologe DNA-Sequenz aus *Brassica napus* zu isolieren, wurden degenerierte Oligonucleotideprimer von der funktional unbekannten DNA-Sequenz aus *Helianthus annuus* (Sperling et al. (1995), s.o.) abgeleitet. Ein 571 bp langes DNA-Fragmentes wurde aus einer lambda-ZAP cDNA-Bank aus reifenden Schoten von *Brassica napus* cv. Ascari (M. Fulda et al., „*Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase“, *Plant Mol. Biol.* 33: 911-922 (1997)) mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) isoliert. Hierzu wurden die degenerierten Primer

BN1 (5'-G[GC][ATGC]TGGTGGAA[AG]TGG-3') und

BN2 (5'-GG[AG]AA[ATGC]A[AG][AG]TG[AG]TG-3')



WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 15 -

eingesetzt, die den Aminosäuresequenzen [GA] WWKW und HHLFP aus *H. annuus* entsprechen.

Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt: 5 min bei 96 °C, gefolgt von 30 Zyklen von 20 s bei 96 °C, 1 min bei 40 °C (Bindungstemperatur,  $T_m$ ) und 2 min bei 72 °C, 1 Zyklus von 10 min bei 72 °C. Für die Amplifikation wurde die Taq-DNA-Polymerase, wenn nicht anders angegeben, von Gibco BRL verwendet. Das 5'-Ende der cDNA wurde mit dem T3-Primer (20 mer) von Stratagene und dem spezifischen Rückprimer

BN3 (5'-TTATGCGTCCATTTCACCA-3')

wie beschrieben mittels PCR amplifiziert, nur daß die  $T_m$  55 °C betrug.

Um das 3'-Ende der DNA zu amplifizieren, wurde cDNA aus mRNA reifender Embryonen von *B. napus* cv. Drakkar eingesetzt. Dazu wurde mRNA mit Hilfe von oligo(dT) Dynabeads nach Gebrauchsanweisung der Fa. Dynal GmbH (Hamburg) aus reifenden Embryonen von *B. napus* cv. Drakkar isoliert. Diese mRNA wurde mittels der Reversen Transkriptase Reaktion zur Einzelstrang cDNA Synthese mit dem SuperScript Preamplification System (Gibco BRL) und einem synthetischen oligo(dT)-Primer

(5'-GA TCTAGA CTCGAG GTCGAC  $T_{14}$ -3'),

der die drei Restriktionsschnittstellen für XbaI, XhoI und Sall trägt (unterstrichen), eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde über SizeSep 400 Säulen der Fa. Pharmacia nach deren Anweisung gereinigt. Anschließend wurde das 3'-Ende der DNA mit dem spezifischen Forwärtsprimer

BN4 (5'-TTCTTTGGCGGGTTGCAGTT-3')

und einem synthetischen oligo(dT)-Primer

(5'-GA TCTAGA CTCGAG GTCGAC  $T_4$ -3')

mittels der o.g. PCR-Bedingungen bei  $T_m$  54 °C amplifiziert.

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 16 -

Die Klonierung und Sequenzierung der doppelsträngigen cDNA-Fragmente aus den verschiedenen PCR-Amplifikationen (571 bp, 5'- und 3'-Ende) erfolgte wie beschrieben (P. Sperling et al. (1995), s.o.): Die DNA-Fragmente wurden mit dem SureClone Ligation Kit (Pharmacia, Freiburg) in den Plasmidvektor pUC18/SmaI legiert, in *E. coli* XL1blue (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) beidsträngig sequenziert. Die, aus den sich überlappenden Teilsequenzen, abgeleitete Länge des vollständigen Klon beträgt 1594 bp (Abb. 1), der für ein offenes Leseraster von 449 Aminosäuren codiert (Abb.2).

Spezifische Primer

BN5 (5'-AACCATCTCTGTTTCAAC-3') und

BN6 (5'-CAA GTGATGATGAGTTAC-3'),

die von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen abgeleitet wurden, wurden in einer weiteren PCR ( $T_m$  55 °C) mit cDNA aus *B.napus* cv. Drakkar eingesetzt. Diese Reaktion wurde mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Ein vollständiger Klon von 1502 bp (PCR-Klon 1) wurde isoliert, mit dem SureClone Ligation Kit (Pharmacia) in pUC18/SmaI legiert und in *E. coli* XL1blue (Stratagene) transformiert. Der Klon wurde beidsträngig mit dem ABI PRISM Dye Terminator Kit (Perkin-Elmer) sequenziert und stimmt mit der Nukleotidsequenz in Fig. 1 und der Aminosäuresequenz in Fig. 2 überein.

Für die spätere Expression in Hefe wurde ein vollständiger Klon (1347 bp), der die kodierende Sequenz beinhaltet, mittels PCR mit den abgeleiteten Primern

BN7, vorwärts 5'-CCGGTACCATGTCGGAGCAGACAAAG-3' und

BN8, revers 5'-CCGAATTC CTAGCCATGAGTATTCAGA-3'

bei  $T_m$  56 °C amplifiziert. Start- und Stopcodon sind fett gedruckt und die angefügten Restriktionsschnittstellen KpnI und EcoRI sind unterstrichen. Ein vollständiger Klon von 1363 bp (PCR-Klon 2) wurde isoliert und mit Hilfe des pGEM-T Vektor Systems

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 17 -

von Promega in *E. coli* XL1blue kloniert. Zur Überprüfung wurde dieser Klon mit dem ABI PRISM Dye Primer Kit (Perkin-Elmer) ansequenziert.

#### Beispiel 2: Isolierung und Klonierung von *sld1* aus *A. thaliana*

Um das *sld1* Gen aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren, wurde eine TBLASTN-Suche (S. F. Altschul et al., „Basic local alignment search tool“, *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410 (1990)) in Datenbanken mit der abgeleiteten Proteinsequenz aus *B. napus* (Fig. 2) durchgeführt. Teile der Proteinsequenz aus *B. napus* wiesen eine signifikante Ähnlichkeit zu folgenden EST-Klonen aus *A. thaliana* auf, deren EMBL Accession-Nummern lauten: T42569 (27-93), N37558 (33-195), F13728 (113-201), T42806 (366- 396), F13717 (421-449). Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Aminosäurepositionen der Rapssequenz (Fig. 2), die von diesen EST-Klonen abgedeckt werden.

Spezifische Oligonucleotidprimer wurden von den Nukleotidsequenzen der EST-Klone

T42569: (AT1, vorwärts) 5'-GCGATTCAAGGCAAGGTCTAC-3' und

F13717: (AT2, revers) 5'-TTAGCCATGAGTATTCAAAGC-3'

abgeleitet, wobei das Stopcodon Fett gedruckt ist. Diese Primer wurden für die PCR-Amplifikation (2 min bei 95 °C, 30 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, 30 s bei  $T_m$  59 °C, 1 min bei 72 °C, 1 Zyklus 10 min bei 72 °C) eines 1272 bp DNA-Fragmentes aus einer lambda-ZAP cDNA-Bank aus *A. thaliana* eingesetzt. Diese cDNA-Bank wurde von dem Genetic Stock Center des Max-Planck Institutes in Köln bezogen, die hauptsächlich aus grünen Pflanzenteilen (Blätter, einige Blüten, wenig Wurzeln) isoliert worden war. Das 5'- bzw. 3'-Ende wurde mittels o.g. PCR ( $T_m$  50 °C) mit der Primer-Kombination T3-Primer (Stratagene) und AT2 bzw. T7-Primer und AT1 amplifiziert. Das 1272 bp DNA-Fragment (PCR-Klon 3) wurde in pUC 19/SmaI und die 5'- und 3'- DNA-Fragmente wurden mit dem pGEM-T Vector System (Promega) in *E. coli* XL1blue (MRF', Stratagene) kloniert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem dem ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt). Aus diesen drei überlappenden Teilsequenzen konnte eine vollständige Sequenz von 1678 bp (Abb. 3) abgeleitet werden, die für ein offenes Leseraster von

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 18 -

449 Aminosäuren kodiert (Abb. 4). Ein vollständiger Klon, der die kodierende Sequenz beinhaltet, wurde mittels PCR mit den abgeleiteten Primern

AT3, vorwärts: 5'-CCGGTACCATGGCGGAAGAGACGGAG-3' und

AT4, revers: 5'-CCGAATTC TTAGCCATGAGTATTCAAAGC-3'

bei  $T_m$  56 °C amplifiziert. Start- und Stopcodon sind fett gedruckt und die angefügten Restriktionsschnittstellen KpnI und EcoRI für die spätere Klonierung in einen Hefe-Expressionsvektor sind unterstrichen. Ein vollständiger Klon von 1363 bp (PCR-Klon 4) wurde isoliert, mit dem pGEM-T Vektor von Promega kloniert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Dieser Klon wurde mit dem ABI PRISM Dye Terminator Kit (Perkin-Elmer) beidsträngig sequenziert und stimmt mit der Nukleotidsequenz in Fig. 3 und der Aminosäuresequenz in Fig. 4 überein.

Die *sld1*-Nukleotidsequenzen aus *B. napus* und *A. thaliana* weisen beide ein offenes Leseraster gleicher Länge auf, das am N-Terminus 9 Aminosäuren kürzer ist als das entsprechende Protein aus der Sonnenblume (P. Sperling et al. (1995), s.o.). Die zwei abgeleiteten Polypeptide von ca. 51-52 kD weisen untereinander 76 % identische Aminosäuren auf und 65 % bzw. 64 % zu der Sonnenblumensequenz. Die höchste Ähnlichkeit der *sld1*-Proteine besteht zu der delta-6 Glycerolipid-Desaturase aus Borretsch (O. Sayanova et al. (1997), s. o.), dessen Proteinsequenz um eine Aminosäure kürzer ist, wobei 60 % bzw. 58 % der Aminosäuren identisch sind (Fig. 5).

#### Beispiel 3: Klonierung und Expression von *sld1* in *Saccharomyces cerevisiae*:

Die Klonierung und Expression von *sld1* erfolgte in Anlehnung an die erfolgreiche Expressionmethode des *fad2*-Gens aus *A. thaliana* in Hefe (S. Kajiwarra et al., „Polyunsaturated fatty Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of Ethanol Tolerance and the *FAD2* Gene from *Arabidopsis thaliana*“, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4309-4313 (1996)). Die amplifizierte *sld1* DNA aus *B. napus* und *A. thaliana* (PCR-Klone 2 und 4), die in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pGEM-T Vektors (Promega) kloniert worden war (s.o.), wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und EcoRI geschnitten. Die 1,4 Kb KpnI/EcoRI-

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 19 -

Fragmente wurden in die KpnI/EcoRI-Stelle des gezippten Hefe-*E. coli* shuttle-Expressionsvektors pYES2 legiert (Invitrogen Co.). Die daraus resultierenden neuen Plasmide, pYES2Bn und pYES2At, sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt und wurden in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Co.) transformiert.

Die DNA-Maxipräparation wurde mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Die isolierten Plasmide pYES2Bn und pYES2At wurden zur Kontrolle nochmals mit dem ABI PRISM Dye Primer Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) ansequenziert und dann in *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen Co.) mit der Polyethylenglycol-Methode (M. von Pein, Dissertation, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf (1992)) transformiert.

Die Selektion erfolgte auf Agarplatten aus komplettem Minimal-Dropout-Uracil (CM)-Medium mit 2% Glucose (F. M. Asubel et al., „Current Protocols in Molecular Biology“, John Wiley & Sons, New York 1995). Die Überprüfung der transgenen Hefekolonien erfolgte mittels einer Minipräparation von Hefepiasmid-DNA (Asubel et al. (1995), s.o.) deren Retransformation in *E. coli* TOP10F', anschließender Minipräparation und Restriktionsanalyse der *E. coli*-Plasmid-DNA mit KpnI/EcoRI. Für den analytischen Vergleich der Transformanten mit dem Hefe-Wildtyp wurde auch der ungeschnittene pYES2-Vektor in INVSc1 (Kontrolle) transformiert.

Die Vorkultur erfolgte durch Animpfen von 2-5 ml CM- 2 % Raffinose-Medium mit einer transgenen Hefekolonie und anschließender Inkubation für 2 d bei 30 °C im Roller bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 4-5. Für die Hauptkultur wurde CM- 2 % Raffinose-Medium mit einem Aliquot der Vorkultur (500 fache Verdünnung) ad OD<sub>600</sub> 0,01-0,02 angeimpft und 24 h bei 30 °C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Induktion der Testkulturen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 0,1-0,5) durch Zugabe von Galaktose ad 1,8 %. Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte nach weiteren 24 h aeroben Wachstum bei 30 °C bei OD<sub>600</sub> 4-5.

Beispiel 4: Analyse der langkettigen Basen aus den Sphingolipiden der Hefetransformanten

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 20 -

Die induzierten Hefezellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 g geerntet, zweimal mit Aqua dest. gewaschen, 20 min in Aqua dest. abgekocht, und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert.

Da *S. cerevisiae* hauptsächlich nur die schwer extrahierbaren Sphingophosphoglycolipide enthält, wurden die langkettigen Basen (LCB) durch starke alkalische Hydrolyse (24 h bei 110 °C) ganzer Zellen (350 mg Frischgewicht) in 10% Ba(OH)<sub>2</sub>/Dioxan (1:1, v/v) freigesetzt (W. R. Morrison et al., „Polar lipids in bovine milk II. Long-chain Bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric *cis* and *trans* monoenoic fatty acids in the sphingolipids“, *Biochim. Biophys. Acta* **202**: 460-467 (1970)). Die LCB wurden aus dem Hydrolysat ad CHCl<sub>3</sub>/Dioxan/H<sub>2</sub>O (6:1:5) extrahiert, die CHCl<sub>3</sub>-Phase abdestilliert. Die freien LCB des Hydrolysats wurden direkt in ihre Dinitrophenyl-Derivate überführt (K.-A. Karlsson, „On the occurrence of sphingolipid long-chain bases“, *Chem. Phys. Lipids* **5**: 6-43 (1970)). Die Dinitrophenyl-LCB wurden mit CHCl<sub>3</sub>/Methanol/H<sub>2</sub>O (8:4:3) extrahiert, dünnschichtchromatographisch in CHCl<sub>3</sub>/Methanol (90:10) gereinigt (K.-A. Karlsson (1970), s.o.) und mit Methanol aus dem Kieselgel extrahiert.

Für die Analyse der Dinitrophenyl-LCB wurde eine Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)-Methode entwickelt. Die Trennung der verschiedenen Spezies erfolgte mit einer ODS Hypersil® RP18-Säule (5 µm, 25 x 4,6 cm) von der Fa. Bischoff. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min: Von 80 % Methanol/Acetonitril/2-Propanol (10:3:1, v/v/v) und 20 % Aqua dest. auf 0 % Aqua dest. in 40 min. Die Elution der Dinitrophenyl-Derivate wurde bei 350 nm massenproportional detektiert (Fig. 8). Die Referenz-LCB wurden von der Fa. Sigma bezogen (Fig. 8 A).

Die HPLC-Analyse zeigte, daß transgene Hefezellen, die das Plasmid pYES2At bzw. pYES2Bn enthalten, mindestens zwei neuartige LCB produzieren (Abb. 8 C, D), die in Wildtyp- und mit pYES2 transformierten Hefen (Fig. 8 B) nicht enthalten sind. Kalkuliert aus den HPLC-Daten, betrug das Verhältnis der neuartigen *cis*- und *trans*-Phytosphingenine (t18:1) bei transgenen Hefen mit pYES2Bn 1:6,7 und mit pYES2At 1:3. Die Stereoisomere delta-8 und delta-9 wurden durch die HPLC nicht getrennt.

Beispiel 5: Analyse der neuartigen langkettigen Sphingobasen mittels NMR und MS

*Isolierung und Derivatisierung der Phytosphingenine:* Für eine chemische Strukturanalyse wurden die LCB aus transgenen Hefezellen (5,7 g Frischgewicht) mittels alkalischer Hydrolyse isoliert (siehe Beispiel 4.). Die Fraktion der freien C18-Trihydroxybasen (Phytosphinganin und Phytosphingenin,  $R_f$  0,34) wurde über Dünnschichtchromatographie in  $\text{CHCl}_3$ /Methanol/ $\text{NH}_4$  (40:40:1) von den restlichen Basen des Hydrolysats abgetrennt (M. Ohnishi et al., *Biochim. Biophys. Acta* **752**: 416-422 (1983)), mit  $\text{CHCl}_3$ /Methanol/1N KOH (2:1:0,75) extrahiert und mit Essigsäureanhydrid, 4-(Dimethylamino)-pyridin in Pyridin per-O-acetyliert (C. M. Gupta et al., „Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups“, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4315-4319 (1977)). Die per-O-acetylierten C18-Trihydroxybasen wurden in n-Hexan gegen Wasser (1:1) extrahiert und in 100% Diethylether dünnenschichtchromatographisch gereinigt. Die Detektion erfolgte mit 0,2 % methanolischer 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure unter UV-Licht und die Extraktion erfolgte mit n-Hexan. Die Auftrennung der per-O-acetylierten Basenfraktion (0,73 mg) in Phytosphinganin (125  $\mu\text{g}$  t18:0,  $R_f$  0,46), in *trans*- (300  $\mu\text{g}$  t18:1<sup>t</sup>,  $R_f$  0,44) und in *cis*-Phytosphingenin (100  $\mu\text{g}$  t18:1<sup>c</sup>,  $R_f$  0,44) erfolgte dünnenschichtchromatographisch über 10 % ige Silbernitrat-Kieselgelplatten (O. Renkonen et al., „Structure of plasma sphingadienine“, *J. Lipid Res.* **10**: 687-693 (1969)) in  $\text{CHCl}_3$ /Methanol (95:5) bei 4 °C. Die Detektion der Banden erfolgte mit 0,2 % methanolischem Dichlorofluorescein unter UV-Licht und die Extraktion erfolgte mit n-Hexan.

*NMR-Spektroskopie:*  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem 600 MHz Bruker Avance DRX 600 Spektrometer, ausgerüstet mit einem Mikroprobenkopf (PH TXI 600SB), mit Kapillarröhrchen von 2,5 mm O.D. (Wilmad, Buena, NJ, USA) gemessen. Die per-O-acetylierten Proben (50 - 300  $\mu\text{g}$ ) wurden in 100  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$  (Cambridge Isotope Lab., MA., USA) gelöst und ihre Spektren bei 300 K mit TMS als internem Standard ( $\delta_{\text{H}} = 0,000$  ppm) aufgenommen. Ein- und zweidimensionale homonucleare  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY-Experimente wurden mit der Standard-Bruker-Software (XWINNMR, Version 1.3) dargestellt.

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 22 -

GC-MS-Analyse: Die gaschromatographische Massenspektroskopie (GC-MS) wurde mit einem Hewlett-Packard Spektrometer Modell 5989 mit einer HP-5 Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm) durchgeführt. Die folgenden Temperaturgradienten wurden für die Analyse der verschiedenen Derivate benutzt: Per-O-acetylierte Phytosphingenine: 3 min bei 230 °C, Gradient von 5 °C/min ad 330 °C und mittelkettige Fettsäuremethylester: 3 min bei 100 °C, Gradient von 10 °C/min ad 330 °C. GC-MS-Analyse wurde im CI- (mit Ammoniak) und EI- Mode (70 eV) durchgeführt.

#### *Derivatisierung der Phytosphingenine für GC-MS*

A) Bleitetraacetat-Oxidation: Ein Aliquot der unfractionierten, peracetylierten C18-Trihydroxybasen (0,36 mg) wurden mit Natriummethylat desacyliert und anschließend mit Pb(OAc)<sub>4</sub> in Chloroform oxidiert. Die resultierenden Aldehyde wurden in Chloroform extrahiert, zur Trockne eingedampft und mit LiAlH<sub>4</sub> in Ether zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. 1/10 der Alkohole wurde mit BSTFA (Sigma) in ihre Trimethylsilyl-Derivate überführt und direkt mittels GC-MS analysiert. Die restlichen Alkohole (9/10) wurden mit Nikotinsäurechlorid in Pyridin zu Nikotinaten umgesetzt, in n-Hexan gegen Wasser extrahiert und mittels GC-MS analysiert.

B) Kaliumpermanganat-Oxidation: Ein Aliquot der peracetylierten C18-Trihydroxybasen wurde unter alkalischen Bedingungen mit KMnO<sub>4</sub> in Methanol/Wasser (2:1) oxidiert. Nach dem Ansäuern wurden die resultierenden Fettsäuren extrahiert und mit etherischem Diazomethan in ihre Methyl-Ester überführt und mittels GC-MS analysiert.

Die Fraktion der per-O-acetylierten C18-Trihydroxybasen aus den mit pYES2At transformierten Hefen wurde mittels GC-MS analysiert, wobei drei distinkte Peaks erhalten wurden. Ein Peak, der bei 15,72 min eluierte, wurde als 2-N-acetamido-1,3,4-tri-O-acetyl-octadecan (Phytosphinganin, t18:0) identifiziert. Die zusätzlichen beiden Peaks eluierten bei 15,30 und 15,45 min wurden als 2-N-acetamido-1,3,4-tri-O-acetyl-octadecen ( $m/z$  144, 423[M-60]<sup>+</sup>, 483[M]<sup>+</sup>) (Phytosphingenin, t18:1) identifiziert. Das t18:0 und die beiden t18:1-Isomere lagen im Verhältnis 3:2:1 vor. Die, nach Bleitetraacetat-Oxidation erhaltenen, zwei Nikotinat-Derivate von t18:1



WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 23 -

fürten bei der GC-MS-Analyse zu zwei Peaks (15,80 und 15,95 min) mit dem erwarteten, molekularen Masseion ( $M = 331$ ). Basierend auf das beobachtete Fragmentierungsmuster der Nikotinate, konnte die Position der Doppelbindung nur annäherungsweise im ersten Peak zwischen C6 und C7 (Penta- $\Delta^6$ -decen,  $m/z = 137, 151, 165, 178, 192, 206, 218, 232$ ) und im zweiten Peak zwischen C7 und C8 (Penta- $\Delta^5$ -decen,  $m/z = 137, 151, 165, 178, 192, 204, 218, 232$ ) lokalisiert werden.

Für eine eindeutige Lokalisation der Doppelbindung wurde die Fraktion der C18-Trihydroxybasen mit Kaliumpermanganat oxidiert und in ihre Fettsäuremethylester (FAME) überführt. Aus dem per-O-acetylierten t18:0 wurde, aufgrund der Oxidation der Diolgruppen zwischen C3 und C4, ein Pentadecansäure-Methylester (C15:0) erhalten. Zusätzlich wurden zwei mittelkettige FAME erhalten und mittels GC-MS als Nonansäure-Methylester (C9:0, 7,5 min) und Decansäure-Methylester (C10:0, 9,0 min) identifiziert. Beide Fettsäuren lagen in einem Verhältnis von 1:3 vor, woraus folgert, daß in der Originalprobe zwei Phytosphingenin-Isomere (t18:1<sup>8</sup> und t18:1<sup>9</sup>) mit unterschiedlicher Lage der Doppelbindung in Position delta-8 und -9 vorlagen. Weiterhin wurden die per-O-acetylierten C18-Trihydroxybasen über AgNO<sub>3</sub>-Dünnschichtchromatographie (TLC) in 125 µg t18:0, 300 µg t18:1<sup>trans 8,9</sup> und 100 µg t18:1<sup>cis 8,9</sup> aufgetrennt. Obwohl die Regioisomere t18:1<sup>trans 8</sup> und t18:1<sup>trans 9</sup> bzw. t18:1<sup>cis 8</sup> und t18:1<sup>cis 9</sup> nicht durch die AgNO<sub>3</sub>-TLC voneinander getrennt wurden, konnte die Bestimmung der *cis*- (Fig. 10B) und *trans*-Stereoisomere (Fig. 10A) mittels NMR durchgeführt werden. Ein- (1D) und zweidimensionale (2D) <sup>1</sup>H-NMR-Experimente (COSY) der gereinigten t18:1<sup>trans</sup> und t18:1<sup>cis</sup> Stereoisomere wurden durchgeführt. Die t18:1<sup>trans</sup>-Fraktion wies nicht-distinkte, aber charakteristische Multiplets für die olefinischen Protonen (-CH=CH-) bei 5.038 ppm auf, die im COSY-Experiment Kreuz-Signale zu den  $\alpha$ -Methylenprotonen (1.879 ppm) zeigen, die charakteristisch für *trans*-olefinische Protonen sind (D. J. Frost et al., The PMR analysis of non-conjugated alkenoic and alkynoic acids and esters, *Chem. Phys. Lipids* 15: 53-85 (1975)). In der t18:1<sup>cis</sup>-Fraktion wurden diese Signale leicht in das höhere Feld für die olefinischen Protonen (5,275 ppm) verschoben, wohingegen die  $\alpha$ -Methylenprotonen in das niedrigere Feld (1,927 ppm) verschoben werden, was wiederum charakteristisch für das *cis*-Isomer ist (D. J. Frost et al. (1975), s.o.).

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 24 -

Von den relativen Anteilen der vier Derivate kann das Verhältnis aller ungesättigten Phytosphingenin-Isomere bestimmt werden. Bei der GC-MS-Analyse der FAME (C10:0 und C9:0), erhalten nach Kaliumpermanganat-Oxidation, wiesen die beiden Regioisomere ein Verhältnis von 3:1 auf, was für eine dreifach stärkere delta-8- als delta-9-Desaturase-Aktivität spricht. Die relativen Massenverteilungen der Stereoisomere bei der AgNO<sub>3</sub>-TLC weisen auf eine dreifach höhere Dominanz des *trans*-Isomers gegenüber der *cis*-Desaturase-Aktivität hin. Die heterologe Expression des *sld1*-Gens aus *A. thaliana* in Hefe führte zur Neubildung von vier Phytosphingenin-Isomeren t18:1<sup>8trans</sup>, t18:1<sup>9trans</sup>, t18:1<sup>8cis</sup> und t18:1<sup>9cis</sup> im Verhältnis von 9:3:3:1.

Die MS- und NMR-Spektren sind in Fig. 9 und 10 gezeigt.

#### Beispiel 6: Klonierung und Transformation von *sld1* in *Arabidopsis thaliana*

Für eine heterologe Überexpression des *sld1*-Gens aus *B. napus* wurde der 1502 bp PCR-Klon 1 in puc19/SmaI kloniert (siehe Beispiel 1.) und mit den Restriktionsenzymen BamHI und SacI geschnitten. Das resultierende 1521 bp DNA-Fragment wurde in Sense-Orientierung in den mit BamHI und SacI geschnittenen Pflanzenexpressionsvektor pBI121 der Fa. CLONTECH hinter den konstitutiven 35S-Promotor (CaMV), anstelle des GUS-Gens, legiert. Das resultierende Plasmid pBIB5Bn ist in Fig. 11 dargestellt.

Für eine homologe Antisense-Ausschaltung des *sld1*-Gens wurde der 1272 bp PCR-Klon 3 aus *A. thaliana* in puc18/SmaI kloniert (siehe Beispiel 2.) und mit BamHI und SacI verdaut. Das resultierende 1283 bp DNA-Fragment wurde in antisense-Orientierung in die BamHI/SacI-Schnittstellen des Vektors pBI121 legiert. Das resultierende Plasmid pBIB5At ist in Abb. 12 dargestellt.

Die Plasmide pBIB5Bn und pBIB5At wurden in *E. coli* XL1blue transformiert und eine DNA-Maxipräparation mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Vollständigkeit und richtige Orientierung der PCR-Klone in pBIB5Bn und pBIB5At wurde einerseits durch verschiedene Restriktionsverdaus (BamHI + SacI, BamHI + EcoRI; XbaI + SacI), andererseits durch erneute Teilsequenzierungen überprüft mit

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 25 -

dem ABI PRISM Dye Terminator Kit (Perkin-Elmer) bei  $T_m$  50 °C und folgenden spezifischen Primern:

35S-Promotor-Primer PRO1: 5'-CACAATCCCACTATCCTT-3' (vorwärts)  
 BN9: 5'-GGAGCTTTGTAAGAAGCAT-3' (revers) und  
 AT5: 5'-GGAATCTCAATCGCGTGG-3' (revers).

Der *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101 mit dem Ti-Helferplasmid pMP90 (C. Koncz et al., „The promotor of  $T_L$ -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes by a novel type of *Agrobacterium* binary vector“, *Mol. Gen Genet.* 204: 383-396 (1986)) wurde mit je einem der binären Vektoren pBI121 (Kontrolle), pBIB5Bn und pBIB5At nach der Methode von H. Chen et al., „Enhanced Recovery of Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* after Freeze-Thaw Transformation and Drug Selection“, *BioTechniques* 16: 664-669 (1994) transformiert. Die transformierten Bakterien wurden 24 h bei 28 °C in Luria-Bertani (LB) Selektivmedium mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin (Sigma) angezogen. Nach der Antibiotika-Selektion auf LB-Agarplatten wurden positive Einzelkolonien mittels PCR bei  $T_m$  50 °C mit folgenden Primerkombinationen überprüft: PRO1 und BN6 für pBIB5Bn; PRO1 und AT1 für pBIB5At. Die Transformation ganzer *A. thaliana* Pflanzen, Ecotyp Columbia (C24) erfolgte *in planta* durch *Agrobacterium*-vermittelte Vakuum Infiltration (N. Bechthold et al. (1993), s.o. und modifiziert von A. F. Bent et al. (1994), s.o.).

#### Beispiel 7: Anzucht und Selektion der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Die *Agrobacterium*-infiltrierten T0-Pflanzen wurden in Töpfen mit Einheitserde/Sand (2:1) in der Klimakammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht) bei 22 °C Tages- und 17 °C Nachttemperatur und 60% Luftfeuchte bis zur Reife angezogen und die T1-Samen vereint geerntet. Die getrockneten Samen wurden mit 4 % NaOCl in 0,02 % Triton® X-100 oberflächensterilisiert, auf Selektiv-Nährmedium (1x MS-salts incl. Gamborg's Vit. B5, Sigma M5519, 0,05 % MES-KOH pH 5,8, 1 % Sucrose, 0,8 % Agar) mit 60 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Nach einer 2 d Kältebehandlung bei 4 °C, um die Keimung zu synchronisieren, wurden die Platten in die Klimakammer transferiert (s.o.). Nach 14 - 20 d wurden die Kanamycin-resistenten T1-Pflanzen in

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 26 -

Erde umgetopft, als Einzelpflanzen geselbstet und die T2-Samen geerntet. Daraus wurden, wie oben beschrieben (V. Katavic et al., „*In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*“, *Mol. Gen. Genet.* **245**: 363-370 (1994)), wiederum Antibiotika-resistente T2-Pflanzen selektioniert, die in einem Verhältnis hetero- zu homozygoter Pflanzen von 2:1 aufspalten.

#### Beispiel 8: Analyse der LCB aus den Sphingolipiden transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Für die nachfolgenden Analysen der Fettsäuren und langkettigen Basen der Sphingolipide wurden Mischproben ganzer T2-Pflanzen (Blätter und Wurzel) direkt von den Selektivplatten verwendet, die aus der Selbstung unabhängiger T1-Pflanzen hervorgegangen sind.

Nach einer Lipidextraktion ganzer T2-Pflanzen in CHCl<sub>3</sub>/Methanol/Wasser (2:1:0,75) wurden die Gesamt-Fettsäuren als Bromphenacyl-ester-Derivate mittels RP-HPLC analysiert (H. P. Haschke et al. (1990), s.o.). Die Analyse transgener T2-Pflanzen, die mit pBIB5Bn bzw. pBIB5At transformiert worden waren, 19 d und 36 d nach Keimung zeigte keine signifikanten Änderungen im Fettsäuremuster gegenüber Wildtyp und Kontrollpflanzen (+ pBI121) und entsprach der Fettsäurezusammensetzung in *Arabidopsis*-Wildtyp Blättern (B. Lemieux et al., „Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition“, *Theor. Appl. Genet.* **80**: 234-240 (1990)). Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung des Lipidextraktes in Aceton/Toluol/Wasser (91:30:8) zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des Ceramid- und Cerebrosidgehaltes in T2-Pflanzen 37 d nach Keimung.

Die Analyse der langkettigen Basen (LCB) aus Sphingolipiden erfolgte wie unter Beispiel 4. beschrieben mit ganzen T2-Pflanzen (Gesamt-Sphingolipide) 19 d, 23 d und 34 d nach Keimung, mit Lipidextrakten (Cerebroside und Ceramide) 21 d und 28 d nach Keimung und mit Lipid-extrahierten T2-Pflanzen (nicht extrahierbare Sphingophosphoglycolipide) 28 d nach Keimung. Die LCB-Analysen der Mischproben zeigten, daß der Gehalt an *cis*- und *trans*-Phytosphingenin (t18:1) in den Gesamt-Sphingolipiden von 80-85 % im Wildtyp bzw. in T2-Kontrollpflanzen (+ pBI121) auf bis zu 5 % in T2-Pflanzen mit pBIB5At (Antisense) bzw. pBIB5Bn

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 27 -

(sense) reduziert wurde (Fig. 13). Während die Antisense-Wirkung in T2-Pflanzen mit pBIB5Bn (sense) auf Co-Suppression-Effekte zurückzuführen ist (Review von J. Finnegan et al., „Transgene Inactivation: Plants Fight Back!“, *BIO/TECHNOLOGY* 12: 883-888 (1994)), war eine Steigerung des Phytosphingenin-Gehaltes in *A. thaliana* durch heterologe Überexpression des *sld1*-Gens aus *B. napus* bei den hohen Ausgangswerten im Wildtyp (s.o.) nur noch um max. 6-9 % möglich. Da der Gehalt und das Verhältnis von *cis*- und *trans*-Phytosphingenin z. B. mit der Pflanzenart variiert (Imai et al., s.o.), würde eine heterologe Überexpression des *sld1* Gens in anderen Organismen zu einer größeren Modifikation der Basenzusammensetzung führen. Weitere Analysen der o. g. Subfraktionen zeigten, daß Cerebroside mehr *cis*-Phytosphingenin und Sphingophosphoglycolipide wesentlich mehr *trans*-Phytosphingenin enthalten. Während der Phytosphingeningehalt in den Cerebrosiden relativ konstant gehalten wird, führt der Antisense-Effekt zu einer drastischen Reduktion dieser LCB-Spezies in den Sphingophosphoglycolipiden.

Die chemische Strukturanalyse des Phytosphingenins in *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch direkte Ba(OH)<sub>2</sub>-Hydrolyse von Wildtyp-Blättern und Extraktion der freien LCB aus dem Hydrolysat (siehe Beispiel 4.). Die C18-Trihydroxybasen wurden wie unter Beispiel 5 beschrieben isoliert und entsprechend analysiert. Die NMR- und MS-Analysen ergaben, daß *Arabidopsis*-Pflanzen im Gegensatz zu den transgenen Hefezellen nur das delta-8-Phytosphingenin (t18:1<sup>8trans</sup> und t18:1<sup>8cis</sup>) enthalten. Die HPLC-Analysen der LCB aus *Arabidopsis*-Pflanzen (Fig. 8 E) sprechen für ein ähnliches Verhältnis der Stereoisomere (t18:1<sup>trans</sup> und t18:1<sup>cis</sup>) von 3:1, wie es bei der heterologen Expression des *sld1*-Gens aus *A. thaliana* in Hefe vorliegt.

#### Beispiel 9: Substratspezifität

Enzymatische Studien haben gezeigt, daß nicht die freien langkettigen Basen, sondern die N-acylierten Basen (Ceramide und komplexe Sphingolipide) desaturiert werden (C. Michel et al., „Characterization of Ceramide Synthesis. A Dihydroceramide Desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 28 -

the level of dihydroceramide", *J. Biol. Chem.* 272: 22432-22437 (1997); J. K. Kok et al., "Dihydroceramide Biology. Structure-specific metabolism and intracellular localization", *J. Biol. Chem.* 272:21128-21136 (1997)).

Unsere Ergebnisse und die Zusammensetzung der LCB-Spezies in Spingolipiden von Pflanzen (Imai et al., s.o.) zeigen, daß die hier isolierten Nukleinsäuren (*sld1*) für eine Sphingolipid-Desaturase codieren, die zur Bildung folgender *cis* (Z)- und *trans* (E)-delta-8-ungesättigter Basen aus D-erythro-2-Amino-1,3-dihydroxy-octadecan (Sphingarin, d18:0), das zum größten Teil außerdem noch delta-4-desaturiert bzw. -hydroxyliert wird, in Pflanzen führt:

- D-erythro-2-Amino-1,3-dihydroxy-8-octadecen (8-Sphingarin, d18:1<sup>8</sup>)
- D-erythro-2-Amino-1,3-dihydroxy-4(E),8-octadecadien(4t,8-Sphingadienin, d18:1<sup>4t,8</sup>)
- D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-8-octadecen (8-Phytosphingarin, t18:1<sup>8</sup>)

Die Expression der pflanzlichen *sld1*-Nukleinsäuren aus *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* führt zur Produktion neuartiger *cis* (Z)- und *trans* (E)-ungesättigter Basen in diesem Organismus:

- D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-8-octadecen (8-Phytosphingarin, t18:1<sup>8</sup>)
- D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-9-octadecen (9-Phytosphingarin, t18:1<sup>9</sup>)

Die Desaturierung von D-erythro-2-Amino-1,3-dihydroxy-octadecan (Sphingarin, d18:0) und anschließende delta-4-Hydroxylierung (Haak et al. (1997), s.o.) führt in den transgenen Hefen zum pflanzentypischen 8-Phytosphingarin, während hier auch die Desaturierung des delta-4-hydroxylierten D-erythro-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-octadecans (Phytosphingarin, t18:0) möglich ist und so zur Bildung des, in der Natur nicht vorkommenden, 9-Phytosphingarins führt. Daraus folgt, daß das pflanzliche Enzym die neue Doppelbindung im Abstand  $\Delta-6$  zu dem letzten Sauerstoff-aktivierten C-Atom der LCB (Hydroxygruppe an C3 des Sphingarins bzw. an C4 des Phytosphingarins) einführt (Abb. 14).

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

- 29 -

Transgene T2-Pflanzen, die mit pBIB5Bn, pBIB5At bzw. pBI121 transformiert worden waren, wiesen das unveränderte Fettsäuremuster des Wildtyps auf, der keine  $\gamma$ -Linolensäure und damit auch keine delta-6-Desaturase-Aktivität aufweist (Lemieux et al. (1990), s.o.). Wie für die transgenen Pflanzen unter Beispiel 8. beschrieben, wurden Gesamtfettsäure-Analysen von induzierten Hefezellen durchgeführt, die mit pYES2Bn, pYES2At oder pYES2 transformiert worden waren (siehe Beispiel 3). Die Analysen der drei Kulturen zeigten das mit dem Wildtyp identische Fettsäuremuster, wodurch eine delta-12-Desaturierung zu Hexadecadien- und Linolsäure ausgeschlossen werden konnte. Transformierte und Wildtyphefen, die exogen applizierte 9, 12-Linolsäure in ihre Glycerolipide inkorporieren, zeigten keine delta-15- oder delta-6-Desaturase-Aktivität, die zur Bildung von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Linolensäure geführt hätte (Girke et al., „Identification of a novel  $\Delta 6$ -acyl-lipid-desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*“, *Plant J.*, in press). Die hier identifizierte Sphingolipid-Desaturase unterscheidet sich eindeutig von einer delta-6-*cis*-Glycerolipid-Desaturase, hinsichtlich ihrer Regio-, Stereo- und Substratspezifität.

WO 00/00593

30

PCT/DE99/01859

### Patentansprüche

1. Sphingolipid-Desaturase die selektiv eine Doppelbindung in die Sphingobase des Ceramidrestes von Sphingolipiden und von Capnoiden einführt.
2. Sphingolipid-Desaturase gemäß Anspruch 1, die eine Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> nach dem letzten sauerstoffaktivierten Kohlenstoffatom (C<sub>1</sub>) der Sphingobase einführt.
3. Sphingolipid-Desaturase gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Aminosäuresequenz der Desaturase eines oder mehrere der Fragmente a) - c) umfaßt:
  - a) HD[A,S]GH,
  - b) HNAHH und
  - c) QLEHH .
4. Sphingolipid-Desaturase gemäß Anspruch 3, wobei die Aminosäuresequenz der Desaturase eine oder mehrere der Fragmente c) - e) umfaßt:
  - c) QLEHH
  - d) AYY<sub>a</sub>X<sub>b</sub>HD[A,S]GH, wobei X<sub>a</sub> und X<sub>b</sub> beliebige Aminosäurereste sind, und
  - e) THNAHH.
5. Sphingolipid-Desaturase gemäß Anspruch 4, wobei das Fragment d) die Aminosäuresequenz AYY<sub>a</sub>GHDAGH aufweist, worin X<sub>a</sub> ein beliebiger Aminosäurerest ist.



WO 00/00593

31

PCT/DE99/01859

6. Sphingolipid-Desaturase gemäß Anspruch 3, 4 oder 5, wobei die Aminosäuresequenz der Desaturase alle drei Fragmente a)- c) oder c) - e) umfaßt.
7. Sphingolipid-Desaturase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Aminosäuresequenz der Desaturase weiterhin die Aminosäuresequenz AWWKWT und/oder FGGLQF umfaßt.
8. Sphingolipid-Desaturase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Desaturase eine der in Fig. 2 oder 4 gezeigten Aminosäuresequenzen umfaßt.
9. DNA-Sequenz, die für eine Sphingolipid-Desaturase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 codiert.
10. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9, die aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* erhältlich ist.
11. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9 oder 10, die die in Fig. 1 oder 3 gezeigten Nukleotidsequenzen umfaßt.
12. Vektor umfassend eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 11.
13. Vektor gemäß Anspruch 12, in dem die DNA-Sequenz mit einem Promotor und optional mit einem Terminationssignal funktional verknüpft ist.
14. Zelle, die mit einem Vektor gemäß Anspruch 12 oder 13 transformiert ist.
15. Zelle gemäß Anspruch 14, die eine Pflanzen-, Pilz-, Bakterien- oder Tierzelle ist.
16. Transgener Organismus, der
  - a) eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 11 umfaßt,
  - b) einen Vektor gemäß Anspruch 12 oder 13 umfaßt und/oder

WO 00/00593

32

PCT/DE99/01859

c) aus einer Zelle gemäß Anspruch 14 oder 15 generierbar ist.

17. Transgener Organismus gemäß Anspruch 16, der eine Pflanze, Pilz, Bakterium oder Tier ist.

18. Pflanze oder deren Nachkommenschaft, die aus der Pflanzenzelle gemäß Anspruch 14 oder 15 generierbar ist.

19. Pflanze gemäß Anspruch 18, die eine Nutzpflanze ist.

20. Pflanze gemäß Anspruch 18 oder 19, die ein verändertes delta-8-Basenmuster in ihren Sphingolipiden aufweist.

21. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen die einen erhöhten oder reduzierten Anteil oder ein verändertes cis/trans-Verhältnis an delta-8-ungesättigten langkettigen Basen aufweisen, umfassend

a) die Transformation einer Pflanzenzelle mit einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 - 11 oder mit einem Vektor gemäß Anspruch 12 oder 13 und

b) die Regeneration einer Pflanze mit verändertem delta-8-Basenmuster in ihren Sphingolipiden.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, wobei die Pflanze eine Nutzpflanze ist.

23. Verfahren gemäß Anspruch 21 oder 22, das

a) zum Kompensieren eines Mangels an delta-8-ungesättigten langkettigen Basen in einem Organismus

b) zum Ausschalten der Produktion an delta-8-ungesättigten Basen,

c) zur Herstellung von Pflanzen mit verbesserter Toleranz und Resistenz gegenüber Bodenversalzung und/oder Ionenstress bzw. -toxizität und/oder Trockenheit und/oder Feuchte und /oder Kälte bzw. Frost und pflanzenpathogenen Mikroorganismen und

d) zur Herstellung von Pflanzen mit geändertem Größenwachstum und Blütezeit

WO 00/00593

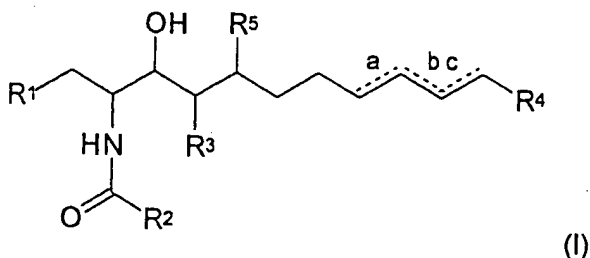
33

PCT/DE99/01859

geeignet ist.

24. Verfahren zur Herstellung von Sphingolipiden und von Capnoiden mit ungesättigter Sphingobase, umfassend das Kultivieren von Zellen gemäß Anspruch 14 oder 15, von transgenen Organismus gemäß Anspruch 16 oder 17 oder von Pflanzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 21.

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, wobei das hergestellte Sphingolipid oder Capnoid die Formel (I)



aufweist, worin

$R^1$  -OH, -OPO<sub>3</sub>HR<sup>6</sup>, ein Kohlenhydratrest oder -SO<sub>3</sub>H ist;

$R^2$  ein C<sub>1</sub>-C<sub>33</sub>-Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Hydroxylresten substituiert sein kann;

$R^3$  und  $R^5$  unabhängig voneinander -H oder -OH sind, oder  $R^3$  und  $R^5$  zusammen eine trans-Doppelbindung bilden;

$R^4$  -H oder ein C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Methylresten substituiert sein kann;

$R^6$  -H, ein Polyhydroxyalkylrest, ein Aminoalkylrest oder ein Kohlenhydratrest ist;

und entweder a, b oder c eine Doppelbindung ist, wobei,

(a) wenn  $R^3$  und  $R^5$  -H sind, a eine Doppelbindung ist, und

(b) wenn  $R^3$  -OH ist und  $R^5$  -H ist, a oder b eine Doppelbindung ist.

26. Verfahren gemäß Anspruch 25, wobei

$R^3$  ein C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylrest ist und

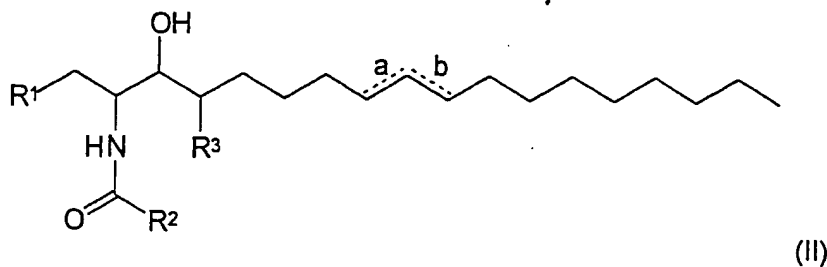
$R^4$  ein C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylrest ist.

WO 00/00593

34

PCT/DE99/01859

27. Verfahren gemäß Anspruch 25, wobei das hergestellte Sphingolipid oder Capnoid die Formel (II)



aufweist, worin  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , a und b die in Anspruch 25 angegebene Bedeutung haben.

28. Verfahren gemäß Anspruch 25, wobei das hergestellte Sphingolipid oder Capnoid eine Sphingobase, ausgewählt aus:

*D-erythro*-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(8Z)-octadecen (t18:1<sup>8c</sup>).

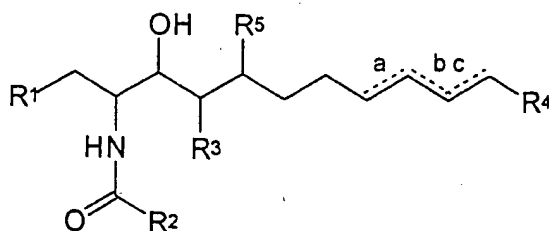
*D-erythro*-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(8E)-octadecen (t18:1<sup>8t</sup>)

*D-erythro*-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(9Z)-octadecen (t18:1<sup>9c</sup>)

*D-erythro*-2-Amino-1,3,4-trihydroxy-(9E)-octadecen (t18:1<sup>9t</sup>),

enthält.

29. Sphinglipid oder Capnoid mit ungesättigter Sphingobase mit der Formel (I):



(I),

worin

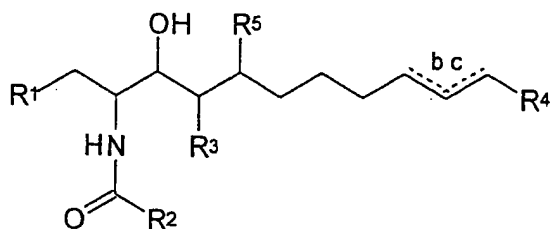
WO 00/00593

35

PCT/DE99/01859

- $R^1$  -OH,  $-OPO_3HR^6$ , ein Kohlenhydratrest oder  $-SO_3H$  ist;  
 $R^2$  ein  $C_1$ - $C_{33}$ -Alkylrest ist, der ein-oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Hydroxylresten substituiert sein kann;  
 $R^3$  und  $R^5$  unabhängig voneinander -H oder -OH sind, oder  $R^3$  und  $R^5$  zusammen eine trans-Doppelbindung bilden;  
 $R^4$  -H oder ein  $C_1$ - $C_{15}$ -Alkylrest ist, der ein- oder mehrfach ungesättigt und/oder mit einem oder mehreren Methylresten substituiert sein kann;  
 $R^6$  -H, ein Polyhydroxyalkylrest, ein Aminoalkylrest oder ein Kohlenhydratrest ist;  
 und entweder a, b oder c eine Doppelbindung ist, wobei,  
 (a) wenn  $R^3$  und  $R^5$  -H sind, a eine Doppelbindung ist,  
 (b) wenn  $R^3$  -OH ist und  $R^5$  -H ist, a oder b eine Doppelbindung ist, und  
 (c) wenn  $R^4$  ein  $C_7$ -,  $C_9$ - oder  $C_{11}$ -Alkylrest ist, a keine Doppelbindung ist, und Derivate derselben.

30. Sphingolipid oder Capnoid gemäß Anspruch 29 mit der Formel (III):



(III),

wobei  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , b und c die in Anspruch 29 angegebene Bedeutung haben.

31. Kosmetikum, Arznei- oder Nahrungsmittel oder chemischer Rohstoff, umfassend

- (a) ein gemäß Anspruch 24 bis 28 hergestelltes Sphingolipid oder Capnoid oder  
 (b) ein Sphingolipid oder Capnoid gemäß Anspruch 29 oder 30.

WO 00/00593

1 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 1

G GATTCTGTTA ATTTCAAGAT  
TCTGATTAAA AACCATCTCT GTTTCACAA TGTCGGAGCA GACAAAGAAG  
AGATTCATTA CAAGCGATGA TCTGAAAAA CACAACCAAC CCGGAGATTT  
ATGGATCTCA ATCCAAGGCA AAGTCTACGA CGTCTCCAC TGGGTCAAAT  
CCCATCCCGG AGGCGAAGCA GCGATCCTAA ACCTCGCCGG TCAAGACGTC  
ACCGACGCGT TCATCGCTTA CCATCCCGGA ACCGCATGGC GCCACCTCGA  
AAACCTCCAC AACGGCTACC ACGTGAAAGA CCACCACGTG TCCGACGTGT  
CGCGTGAATA CCGTCGTTTA GCCGCGGAGT TTTCCAAACG CGGACTCTTC  
GATAAAAAAG GTCACGTGAC TCTTTACACG CTCACGTGCG TCGCTGCCAT  
GCTCGCGGCG GTTGATATACG GTGTTGTTGC ATGCACGAGC ATATGGGCCC  
ACTTAATATC CGCCGTCTTG CTGGGCCTTC TCTGGATACA GAGCGCTTAC  
GTGGGACATG ACTCTGGTCA TTACAACGTG ACGTCAACGA AGCCGTGTAA  
TAAACTCGTC CAGCTTCTGT CTGGTAACTG CATCACCAGG ATATCGATCG  
CGTGGTGGAA ATGGACGCAT AACGCTCACC ATATCTCTTG TAATAGTCTT  
GACCACGATC CTGATCTCCA GCACATCCCT GTCTTAGCGG TCTCCAACAA  
GTTCTTTAAG TCGATGACGT CACGTTTCTA TGGGAGGAAG TTGACGTTCTG  
ATCCACTAGC TCGATTCTTG ATCAGCTACC AACACTGGTC GTTTTATCCA  
ATCATGTGTG TGGGGAGAAT CAATCTCTTT ATCCAAACGT TACTTTTGCT  
ATTCTCGAGA CGTTACGTTT CTGATCGAGC CTTGAACATA GCTGGGATTC  
TTGTTTCTG GACGTGGTTT CCTCTTTTAG TATCCTTCCT ACCAAACTGG  
CAAGAGAGGA TCATCTTTGT CTTTTTAAGC ATGGCCGTCA CGGCGATTCA  
GCACGTTTCA TTCTGTTTAA ACCATTTTGC GGCAGATGTT TACACCGGTC  
CGCCTAATGG GAACGATTGG TTTGAGAAGC AAACAGCTGG TACGCTTGAT  
ATATCGTGTA GGTCTGATAT GGATTGGTTC TTTGGCGGGT TGCAGTTTCA  
GCTAGAGCAT CATCTGTTCC CTAGGCTACC GCGTTGCCAT CTCAGGGGAG  
TTTCGCCTGT GGTTCAGGAG CTTTGTAAGA AGCATAATCT ACCGTATAGG  
AGTCTTTCGT GGTGGGAGGC TAATGTGTGG ACGCTCAGGA CTCTGAGGAA  
AGCGGCGGTT CAAGCTAGAG ATGTGACTAA TCCTGTGTTG GAGAATTTGC  
TATGGGAAGC TCTGAATACT CATGGCTAGA AAAAAAACT GAACAGTACA  
GATCGGTTTT GTTCGGTTT TGCATGGTGG TTAATTTTCGT TTGTTATGTA  
CTTTTCTAGT GGAAGAGATG TGTTAAGTTT TGTTTTTTTT TGATGTAAC  
CATCACTTGA TCTCATCAA AATATGTACT TAATTTTCATT TTTGTGATCA  
GTTATTATAA TGTTTCTGGC TCC

WO 00/00593

2 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 2

MSEQTKKRFI TSDDLKKHNO PGDLWISIQG KVDVSHWVK SHPGGEAAIL  
NLAGQDVTDA FIAYHPGTAW RHLENLHNGY HVKDHHVSDV SRDYRRLAEE  
FSKRGLFDKK GHVTLYTLTC VAAMLAADVY GVVACTSIWA HLISAVLLGL  
LWIQSAYVGH DSGHYNTST KPCNKLVQLL SGNCITGISI AWWKWTNNAH  
HISCNSLDHD PDLQHVPVLA VSNKFFKSMT SRFYGRKLTF DPLARFLISY  
QHWSFYPI MC VGRINLFIQT LLLLFSSRYV PDRALNIAGI LVFWTWFP LL  
VSFLPNWQER IIFVFLSM AV TAIQHVQFCL NHFAADVYTG PPNGNDWFEK  
QTAGTLDISC RSYMDWFFGG LQFQLEHHLF PRLPRCHLRG VSPVVQELCK  
KHNLPYRSL S WVEANVWTLR TLRKAAVQAR DVTNPVLENL LWEALNTHG

WO 00/00593

3 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 3

GAGACAGAGA GAGATTCAAA AATCCGATTC CAGATCCATT CCTGGGCAAA  
CAAAGGTTGG TGTTTCTCTA ATCTCAAAGC TTTTCTCAAA TTCGGAAGAA  
GCAAATCGTG GGAAGAGATT CATCTTCTCT CTGTGCGTTC ATCGGATCTC  
GGAGCTTTTG GTTCGTCTGC AATGGCGGAA GAGACGGAGA AAAAGTACAT  
TACGAACGAA GATCTTAAAA AACACAACAA ATCTGGAGAT CTATGGATCG  
CGATTCAAGG CAAGGTCTAC AACGTCTCCG ATTGGATTAA AACTCATCCC  
GGAGGCGACA CGGTGATTCT CAATCTCGTT GGTCAAGACG TCACCGATGC  
TTTCATCGCA TTTCATCCCG GAACCGCTTG GCACCATCTC GACCATCTCT  
TCACCGGTTA CCACATCAGA GATTTCCAAG TCTCCGAAGT CTCACGCGAT  
TACCGTCGTA TGGCTGCCGA GTTTCGTAAA CTCGGTCTCT TCGAAAACAA  
AGGTCACGTT ACTCTCTACA CTCTAGCCTT CGTCGCCGCC ATGTTCTCTG  
GAGTTCTCTA CGGTGTTTTG GCTTGACCT CCGTCTTCGC TCACCAAATC  
GCCGCCGCGC TTCTCGGTCT CCTCTGGATC CAGAGCGCTT ACATAGGTCA  
CGATTCTGGT CATTACGTTA TCATGTCGAA CAAATCTTAT AACAGATTCT  
CTCAGCTTCT CTCCGGTAAC TGTCTCACC GAAATCTCAAT CGCGTGGTGG  
AAATGGACTC ACAATGCTCA TCATCTAGCT TGTAACAGCC TCGATTACGA  
TCCAGATCTA CAACACATCC CTGTCTTCGC CGTCTCCACC AAATTCTTCT  
CCTCATTGAC CTCGAGATT TACGATCGGA AACTCACGTT TGATCCAGTC  
GCGAGATTCT TAGTCAGCTA TCAACACTTT ACTTATTATC CAGTTATGTG  
CTTTGGAAGA ATCAATCTCT TCATTCAAAC GTTTCTCTTG CTCTTCTCCA  
AACGTGAAGT ACCAGATCGT GCTTTAAACT TCGCCGGAAT CTTAGTCTTC  
TGGACTTGGT TCCCACCTTT AGTCTCATGT CTACCAAAT GGCCTGAGAG  
ATTCTTCTTC GTCTTCACAA GCTTCACCGT CACGGCGCTT CAACACATTC  
AATTCACGCT TAACCATTTC GCTGCTGATG TCTACGTTGG TCCACCCACC  
GGTAGCGACT GGTTCGAGAA GCAAGCGGCG GGAACAATCG ATATCTCTTG  
TAGATCATAC ATGGATTGGT TCTTTGGTGG ATTACAGTTT CAGCTTGAGC  
ATCATTGTT CCCTCGCTTA CCTCGTTGCC ATCTCCGGAA AGTTTCTCCG  
GTGGTTCAAG AGCTTTGCAA GAAGCATAAT CTCCGTATA GGAGTATGTC  
GTGGTTTGAA GCAAATGTGT TGACCATTA CACTTTGAAG ACAGCAGCTT  
ATCAAGCTAG AGACGTGGCT AATCCGGTGG TTAAGAACTT GGTGTTGGAA  
GCTTTGAATA CTCATGGCTA AATGATTTTA ATCAAAACAA AATATGCTTT  
TGTTTGGGTT AAATTTGATG TGTTGTTTTT ATGCTTTATT GAATCTTTGA  
ATTTGTTTTT GTTACTTACT TACATGGAAG AGACGTTTTA GATCGAAATT  
GAATCGAGAT TTGATTTTTT TATTAGAC



WO 00/00593

4 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 4

MAEETEKKYI TNEDLKKHNK SGDLWIAIQG KVYNVSDWIK THPGGDTVIL  
NLVGQDVTDA FIAFHPGTAW HHL DHLFTGY HIRDFQVSEV SRDYRRMAAE  
FRKLGLFENK GHVTLTYLAF VAAMFLGVLY GVLACTSVFA HQIAAALLGL  
LWIQSAYIGH DSGHYVIMSN KSYNRFQALL SGNCLTGISI AWWKWTHNAH  
HLACNSLDYD PDLQHIPPVFA VSTKFFSSLT SRFYDRKLT F DPVARFLVSY  
QHFTYYPVMC FGRINLFIQT FLLFSKREV PDRALNFAGI LVFWTWFP LL  
VSCLPNWPER FFFVETSETV TALQHIQFTL NHFAADVYVG PPTGSDWFEK  
QAAGTIDISC RSYMDWFFGG LQFQLEHHLF PRLPRCHLRK VSPVVQELCK  
KHNLPYRSMS WFEANVLTIN TLKTAAYQAR DVANPVVKNL VWEALNTHG

WO 00/00593

5 / 17

PCT/DE99/01859

```

                20                      40                      60
BoDes6 : -----MAAQI-KKYITSDELKNHDKPGDEWISIQGKAYDVS DWVKOHPPGGSFPLKS : 50
HaDes7 : MVSPSIEVLNSIADGKKYITSKELKKHNNPNDEWISILGKVYNUTEWAKZHPGGDAPLIN : 60
BnDes8 : -----MSEQTKKRFTISDDEKKHNPQPGDEWISIQGKVYDVS HWVKSHPPGGEAAILN : 51
AtDes8 : -----MAEETEKKYITNEDLKKHNSGDEWIAIQGKVYNVSDWIKTHPPGGDTVLIN : 51

                80                      100                     120
BoDes6 : LAGQEVTDAEVAFHEASTWKNEDKFFTGYLKDYSMSEVSKDYRKLVFEBSRMGLYDKKG : 110
HaDes7 : LAGQDVTDAPINFHGPTAWKHEDCKLFTGYHLKDYQSDISRQYRKLA SEFAKAGHFEKKG : 120
BnDes8 : LAGQDVTDAPINFHGPTAWKHENLHNGYHVYKHVSDVSPDYRRLAAEESXRGFLFKKG : 111
AtDes8 : LVGQDVTDAPINFHGPTAWKHEDHLEFTHIRBFQVSEVSRDYRMAAEERKLGLFENKG : 111

                140                     160                     180
BoDes6 : HIMFATECFIAMLFAMSVGVLFCEGVLVHLSFGCLMGFLWIOSGWICHDA GHMVVSDS : 170
HaDes7 : HGVYSECFVSLLSACVYGVLYSGSFWIHM LSGAILGLAWMOIAYLEHDA GHVOMMATR : 180
BnDes8 : HVTLYTETCAAMLAADVGVVACTSIWAHLISAVLLGLLWIOSAYVGRDSCHVNVSTK : 171
AtDes8 : HVTLYTEAFVAAMFLGVLELV LACTSVFAQIAAALLGLLWIOSAYIGHSGHYVIMS NK : 171

                200                     220                     240
BoDes6 : RLNKFMGIFAANCLSGSGWKNHNAHIAONSEYDEDLQYIEFLVMSCHFFGSLKS : 230
HaDes7 : GWNKFAGIFIGNCITGSAWKKWTHNAHIAONSEYDEDLQHLMLANSKLENSTES : 240
BnDes8 : PCNKLVLQSLGNCITGESAWKKWTHNAHIAONSEYDHPDDEQHI EVLAVSNKFKSMTS : 231
AtDes8 : SYNRFAQLLSGNCITGESAWKKWTHNAHIAONSEYDHPDDEQHI EVFAMSTKFSLSLT : 231

                260                     280                     300
BoDes6 : HEYEKRTFDSLSREFVSVHWTFFINCAALNMYVQSLIMELTKRNVSYRAQELLECH : 290
HaDes7 : VEYGRQTEPLAREFVSCHYLZYINGVARVNLVLOTILLISKRKIPDGLNLTGTH : 300
BnDes8 : REYGRKTEPLARELISYQHSFLEMCVGRINLFIO TLLEFSRHYVPDRALNIAGIT : 291
AtDes8 : REYDRKTEPLARELVSYCHFTYVVMGFGRINLFIO TLLEFSKREVPDRALNFAGIT : 291

                320                     340                     360
BoDes6 : VPSINVEVVSCEPNNGERIMEVIASLSLGMQOVQSENHSSSSVVGKPKGNWEEKQ : 350
HaDes7 : IEWTNFEPLVSRLNPPERVAEVLVFCMTGIGHIOFTENHESGDVVGPPGOGNWEERH : 360
BnDes8 : VEWTNFEPLVSFEENWOERIIIVFLSMATAIGHVQECENHEAADVTPSPNGNDNEEKQ : 351
AtDes8 : VEWTNFEPLVSCEPNPERFFFTFTFTVALGHIOFTENHEAADVSPPTGSDWEEKQ : 351

                380                     400                     420
BoDes6 : TDCILLESPPWMDVHCCGOFOLPHHAKKMBNNAKISHYVISCKRHNHNYAEF : 410
HaDes7 : TRGTLFACSSWMDVFCGLOFOLPHHAKKMBNNAKISHYVISCKRHNHNYAEF : 420
BnDes8 : TAGTLFACSSYMDVFCGLOFOLPHHAKKMBNNAKISHYVISCKRHNHNYAEF : 411
AtDes8 : AAGTLFACSSYMDVFCGLOFOLPHHAKKMBNNAKISHYVISCKRHNHNYAEF : 411

                440
BoDes6 : SKANEMLRTRNTALORRHITKELPKNVWVWELHETHG : 448
HaDes7 : YDRNVTELRTRNTALORRHITKELPKNVWVWELHETHG : 458
BnDes8 : WEANVWELRTRNTALORRHITKELPKNVWVWELHETHG : 449
AtDes8 : FEANVLELNTKTAAYQAEVANVVKNVWVWELHETHG : 449

```

Fig. 5

WO 00/00593

6 / 17

PCT/DE99/01859

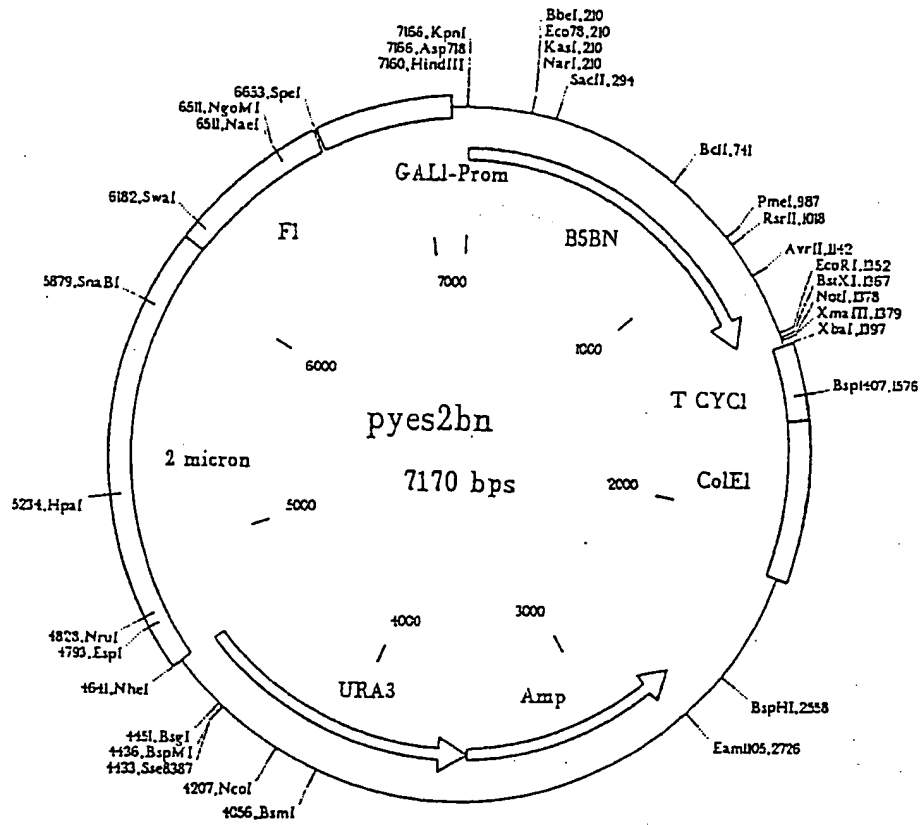


Fig. 6

WO 00/00593

7 / 17

PCT/DE99/01859

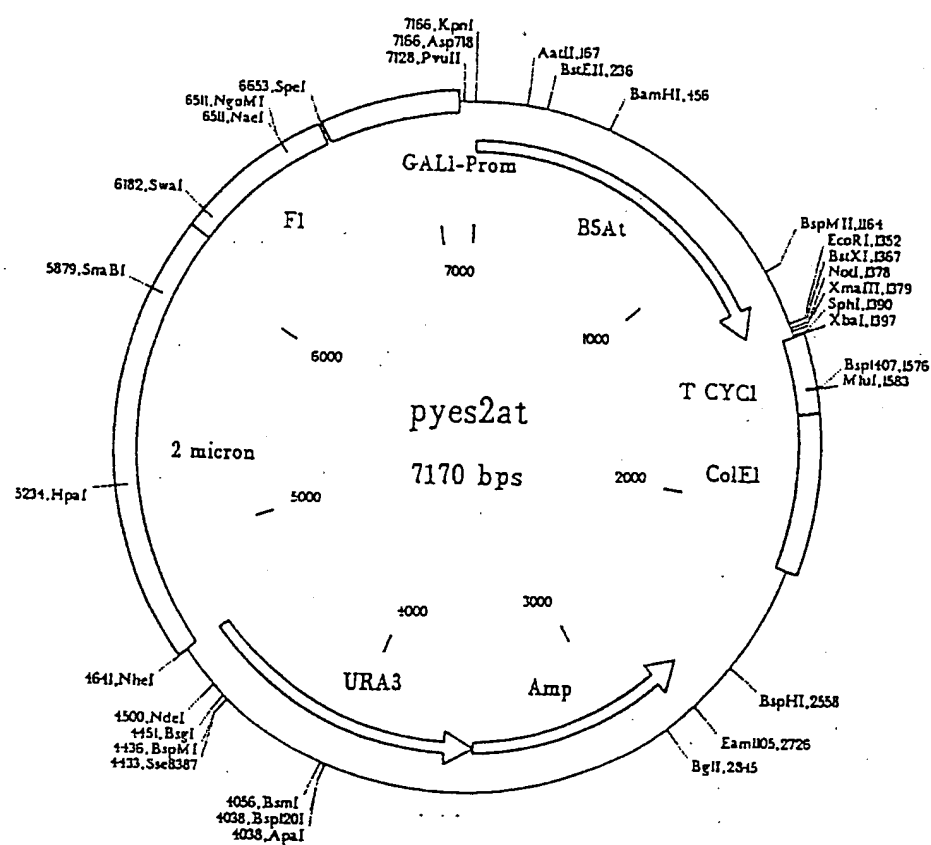


Fig. 7

WO 00/00593

8 / 17

PCT/DE99/01859

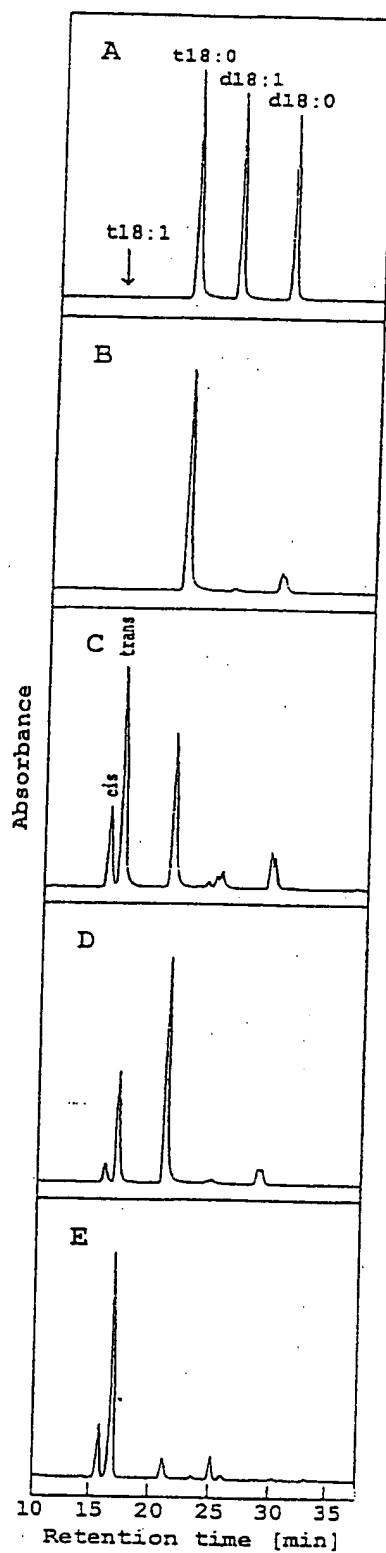


Fig. 8

WO 00/00593

9 / 17

PCT/DE99/01859

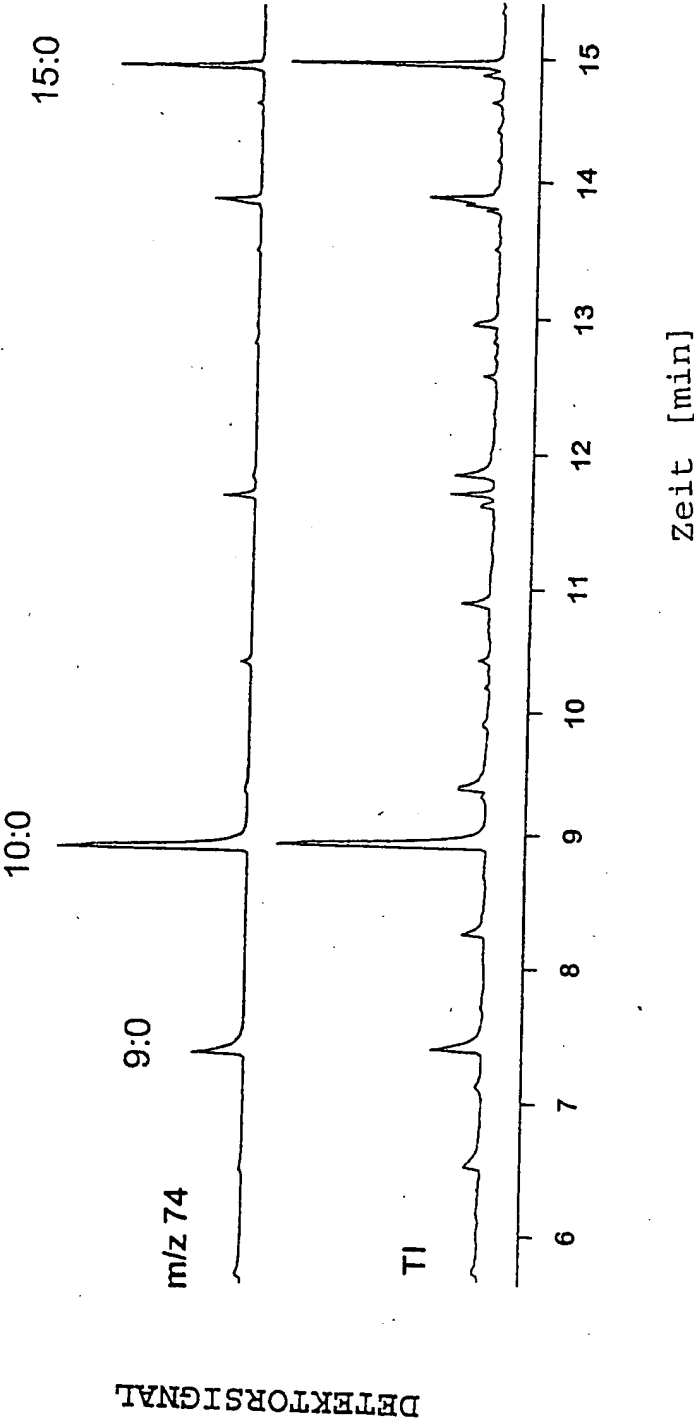


Fig. 9

WO 00/00593

10 / 17

PCT/DE99/01859

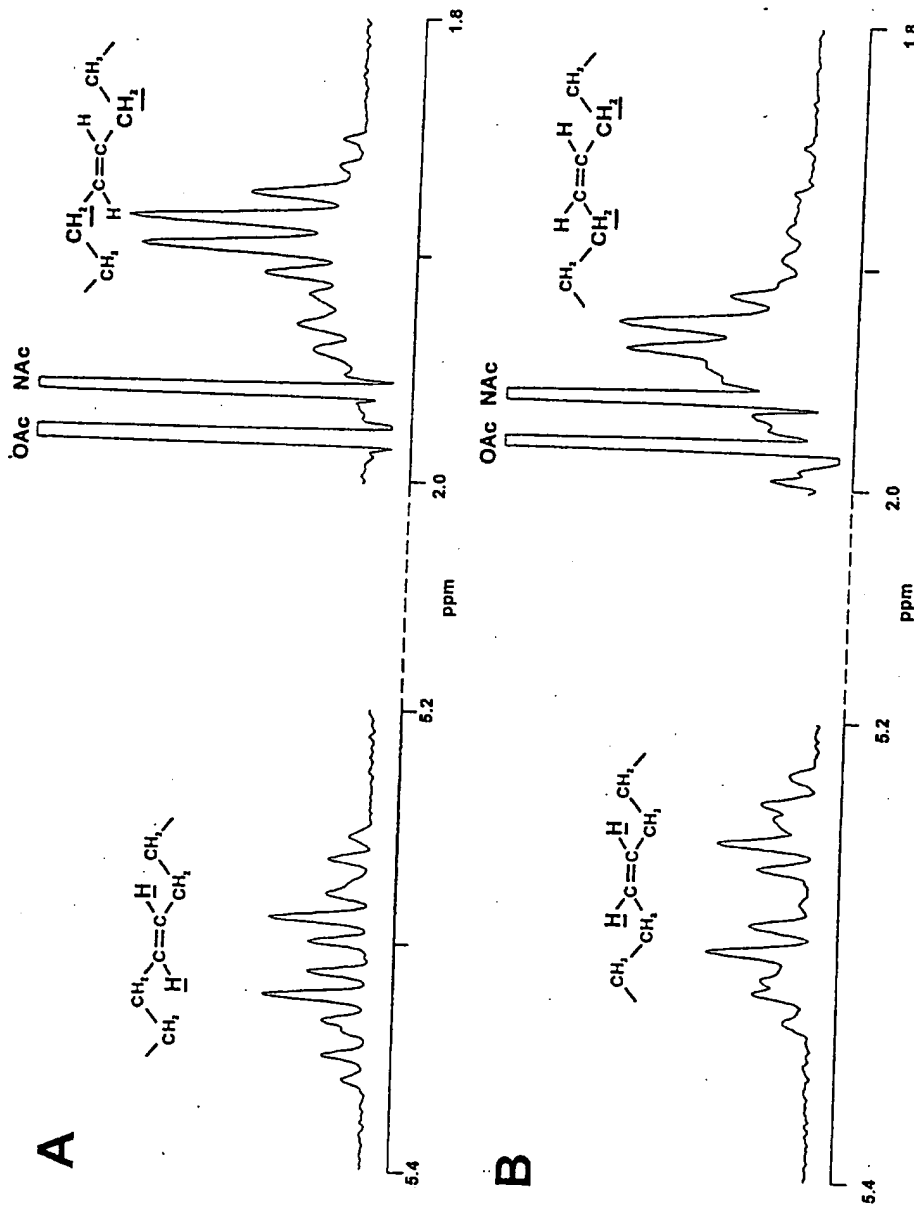


FIG. 10

WO 00/00593

11 / 17

PCT/DE99/01859

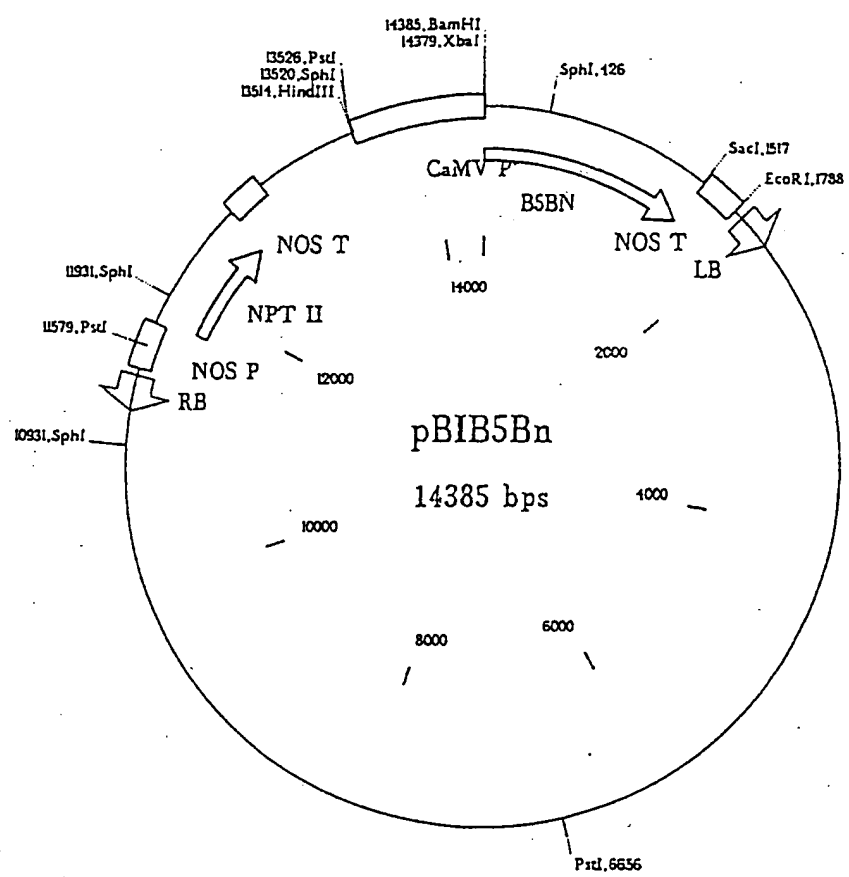


Fig. 11



WO 00/00593

12 / 17

PCT/DE99/01859

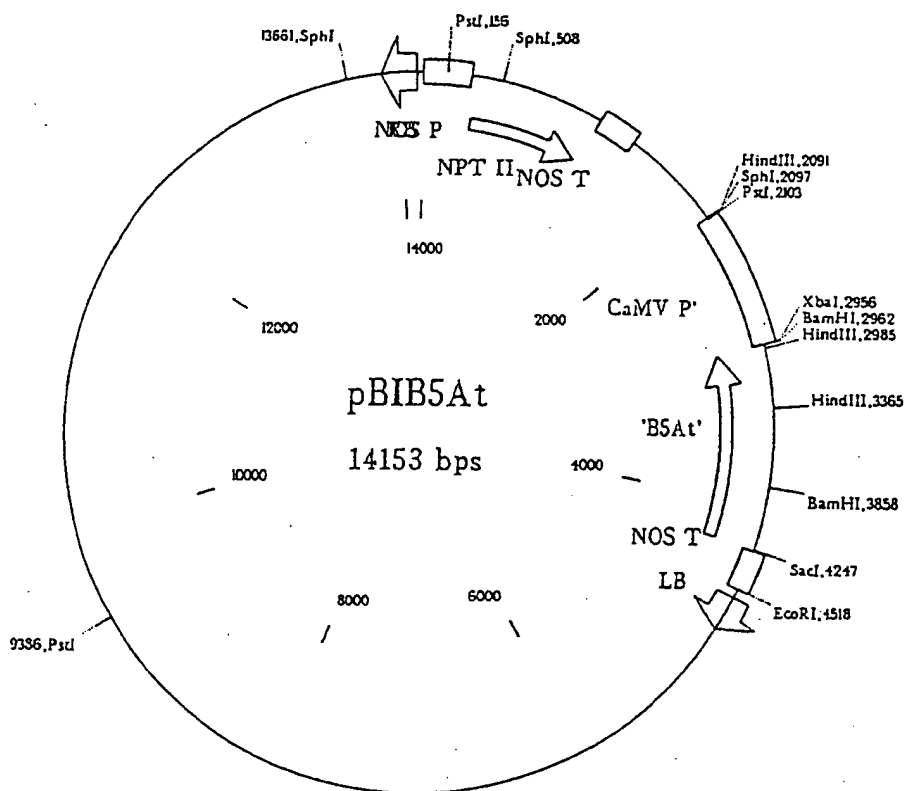


Fig. 12

WO 00/00593

13 / 17

PCT/DE99/01859

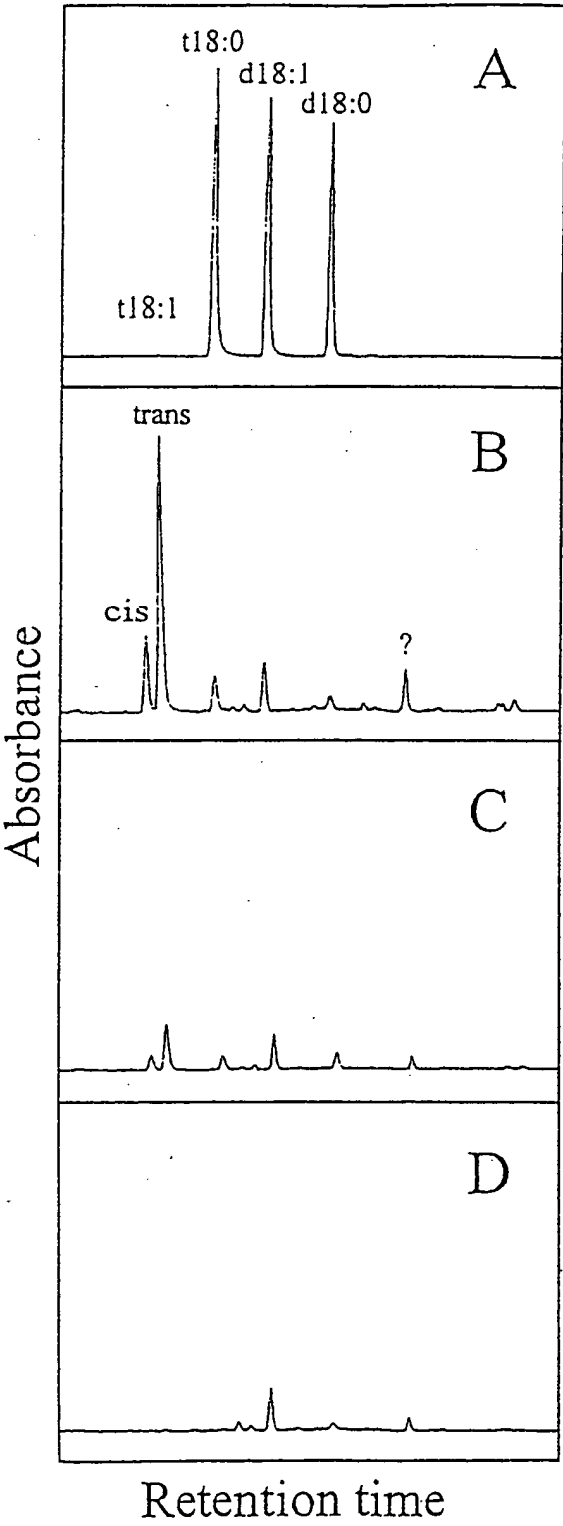


Fig. 13

WO 00/00593

14 / 17

PCT/DE99/01859

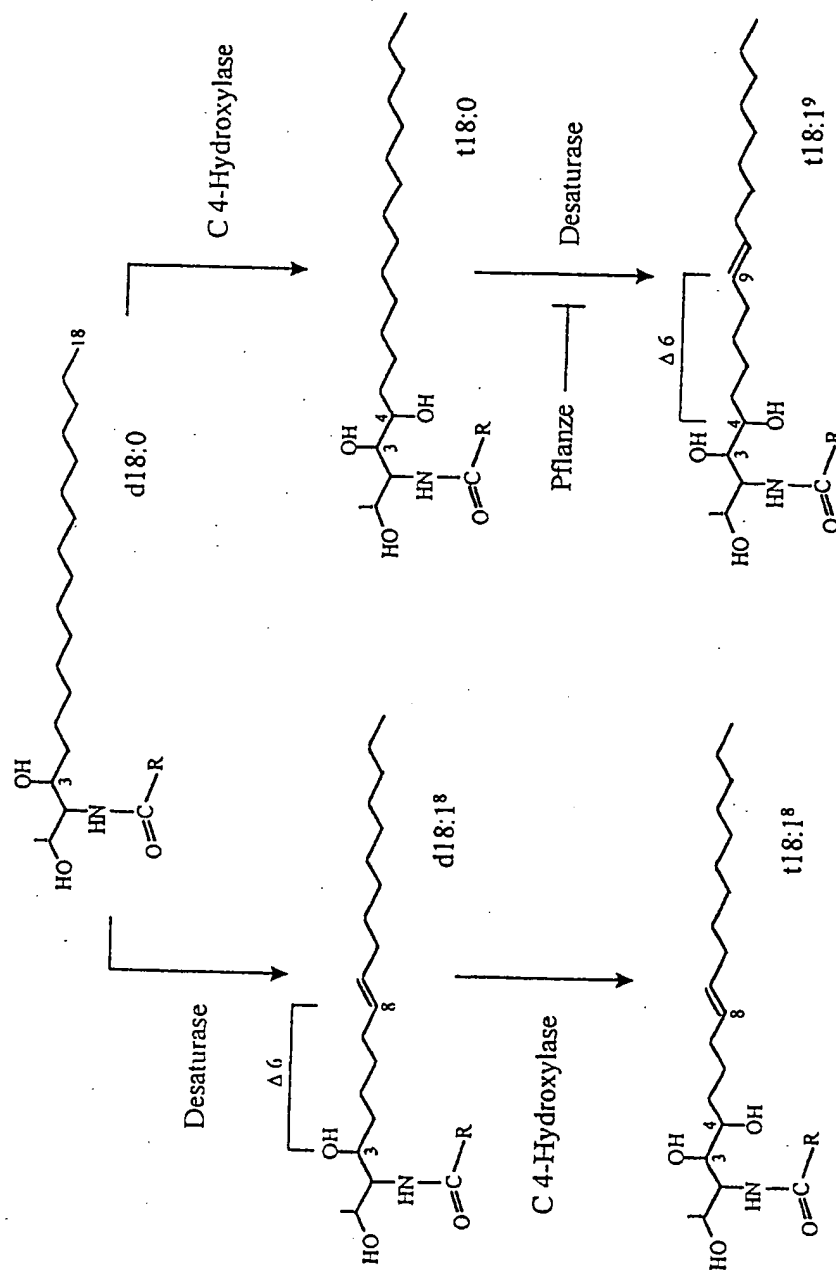


Fig. 14

WO 00/00593

15 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 15

1 GGGGGGGGGGGGGGACCACATCAACAACACTCTCCGATTCCGCCCTCGCCGCAGCTTTT

M V S P S I E V L N S 11

61 ACATATCCTCCGGTGAACTCATCGTCGATGGGTGCGCATCCATAGAAGTGTTGAATTCA

I A D G K K Y I T S K E L K K H N N P N 31

121 ATTGCTGATGGAATAAATACATAACATCAAAGAGTTAAAGAAGCATAAACACCTTAAT

D L W I S I L C K V Y N V T E W A K E H 51

181 GACCTTTGGATCTCAATTTTGGGCAAGGTTTACAACGTTACAGAAATGGGCTAAAGAGCAT

P G G D A P L I N L A G Q D V T D A F I 71

241 CCGGGTGGCGATGCCCCGTTGATTAATCTCGCGGCCAGGATGTAAGTGACGCATTATC

A F H P G T A W K H L D K L F T T C G Y H L 91

301 GCATTCTACCCGCTACTCGGTGAAGCATCTAGACAACTATTACCGGGTCACTTA

K D Y Q V S D I S R D Y R K L A S E F A 111

361 AAAGATTACCAAGGTTTTCTGACATTTCTAGAGACTACCGGAAAACCTCGTTTCAGAGTTTGCA

K A G M F E K K G H G V I Y S L C F V S 131

421 AAAGCGGGTATGTTGAGAAGAAAGGTACCGGTGTAATTTACTCACTTTGTTTCGTGTGC

L L L S A C V Y G V L Y S G S F W I H M 151

481 CTACTGCTTCCGCTTGTTGTATGCGCGTGTATATTCCGGAAGCTTCGTGGATTCAATG

L S G A I L G L A W M Q I A Y L G H D A 171

541 CTTTCGGGGCGGATATTGGGATTAGCATGGATGCAAAATGCGCTATTTTGGGTCATGACGGG

G H Y Q M M A T R G W N K F A G I F I G 191

601 GGTCAATTACCAATGATGGCGACCGCGGGTGGAAACAAGTTTCCCGGAATATTTATCGGG

N C I T G T A I S C I A W G K W T H N A H H I 211

661 AATCTATAACCGGAATAAGCATCGCGTGGAAATGGAGCATAACGCACATCACATC

A C N S L D Y D P D L Q H L P M L A V S 231

721 GCTTGTAAACAGTCTTGATTATGATCCTGATCTTCAGCATTACCGATGTTAGCGGTTTTCT

S K L F N S I T S V F Y G R Q L T F D P 251

781 TCCAAGCTTTTAACTCAATAACTTCTGTTTTCTATGGGAGACAGTTGACCTTTGACCCG

L A R F F V S Y Q H Y L Y Y P I H C V A 271

841 TTAGCCCGGTTCTTCGTGAGCTACCAGCATTAATTATATTACCGGATCATGTGTGTGGCC

R V N L Y L O T I L L L I S K R K I P D 291

901 CGGGTCAACCTCTATTTACAAAACATCCTGTGTGATTTCAAACGAAAGATTTCCCGAC

R G L N I L G T L I F W T W F P L L V S 311

961 AGAGGTTTAAACATATCGGAACCTTAATCTCTGGACGTGGTTTCGGTTACTGTTTCT

R L P N W P E R V A F V L V S F C V T G 331

1021 CGCTTACCGAACTGGCCCGAACCGGTGGCGTTTGTGTGGTTAGCTTCTGTGTAACGGGT

I Q H I Q F T L N H F S G D V Y V G P P 351

1081 ATACAACATATTCAGTTTACACTGAACCATTTTTCTGGGATGTTTACGTGGGCCCCCCA

K G D N W F E K Q T R G T I D I A C S S 371

1141 AAAGGAGACAATTGGTTCGAGAAACAAACGGGTGGGACCATCGATATCGCGGTGTTCTTCT

W H D W F F G G L Q F Q L E H H L F P R 391

1201 TGGATGGATTGGTTTTTCGGAGGTTTACAGTTTCAACTTGAGCACCATTGTTTCTTAGG

L P R C H L R S I S P I C R E L C K K Y 411

1261 TTGCCACGGGTGCACTTGAGGTGCAATTTCTCCTATATAGAGAAGCTTGCAGAAATAT

N L P Y V S L S F Y D A N V T T L K T L 431

1321 AACTTACCTTATGTGAGTTTGTCTGTTTTATGATGCGAATGTAAGGACCTTGAAGACGCTT

R T A A L Q A R D L T N P A P Q N L A W 451

1381 AGGACAGCGGCTCTACAGGCACGTGACCTTACGAAACCGGCCCCACAGAAATTTAGCTTGG

E A F N T H G \* 458

1441 GAAGCTTTCAACACCCATGGTTGAAGCTTCTATCATCTATGTTGGTACTCATCTCGGCTA

1501 CTTTGTGTAAGAAGGCTTTGAGCATTTTTCTGGGCTTTTATGTATCTTAAAACTAAATATG

1561 GACTATGATTATTTATATATTITGGATTATTAAAAAAAAAAAAAA

WO 00/00593

16 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 16/1

HaDES?	-----
BnDES8	-----
AtDES8	-----
d51pu	-----
<u>b51bo</u>	-----
BoDES6	-----
d52pu	-----
b5cae	-----
2b5ce	-----
b5pp	MVFAGGGLQQGSLEENIDVEHIASMSLFSDFFSYVSSTVGSWSVHSIQPLKRLTSSKKRVS
HaDES?	-----MVSPSIEVLNSIADG---KKYITSKELKKHNNPND--
BnDES8	-----MSEQTK---KRFITSDDLKKHNPQGD--
AtDES8	-----MAEETE---KKYITNEDLKKHNSGSD--
d51pu	-----
<u>b51bo</u>	-----
BoDES6	-----MAAQI---KKYITSDELKNHDKPGD--
d52pu	-----
b5cae	-----MVVDKN-ASGLRMKVD--GKWLYLSEELVKKHPGGAV
2b5ce	-----MVLREQEHEPFFIKID--GKWCQIDDAVLRSHPGG--
b5pp	ESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQWKSTHPLSEVAVHNKPSD--
HaDES?	-----LWFSILG-----KVYNVTEWAKEHPGGDAPLINLAGQ
BnDES8	-----LWISIQG-----KVYDVSHVVKSHPGGEAAILNLAGQ
AtDES8	-----LWIAIQG-----KVYNVSDWIKTHPGGDTVILNLVGQ
d51pu	-----
<u>b51bo</u>	-----
BoDES6	-----LWISIQG-----KAYDVS DWVKDHPGGSFPLKSLAGQ
d52pu	-----
b5cae	IEQYSIPPLNKNIETRGIITTRGSSNALDILYFYRNSDATHIFHAFHEGSSQAYKQLDLL
2b5ce	-----S-----YKNMDATTVFHTFHTGSKEAYQWLTEL
b5pp	-----CWIVVKV-----KVYDVS NFADHPGGS-VISTYFGR
HaDES?	DVTDAFIAFHPGTAWKHLDKLFTGYHLKDYQVSDISRDRYKLASEFAKAGMFEKKGH-GV
BnDES8	DVTDAFIAFHPGTAWRHLENLHNGYHVKDEHVSDVSRDYRLAAEFSSKRGFLDKKGH-VT
AtDES8	DVTDAFIAFHPGTAWHHLDFLTGYHIRDQVSEVSRDYRMAAEFRKLGLFENKGH-VT
d51pu	-----
<u>b51bo</u>	-----
BoDES6	EVTDAFVAFHPASTWKNLDKFFTGYYLKDYSVSEVSKDYRKLVPFESKMGLYDKKGH-IM
d52pu	-----
b5cae	KKHGEHDEFLEKQLEKRLDK--VDINVSAYDVSVAQEKQMVESFEKLRQKLHDDGLMKAN
2b5ce	KKECPTQEPEIPDIKDDPIKGIDDVNMGTFNISEKRSQAINKSFDTLRMRVRAEGLMDGS
b5pp	DGTDVFSFHAASTWKILQDFYIGDVERVEPTPELLKDFREMRALFLREQLFKSSKL-YY
HaDES?	IYSLCFVSLLLSACVYGVLYSGSFWIHM LSGAILGLAWMQIAYLGH DAGHYQM MATRGWN
BnDES8	LYTLTCVAAMLAAVVYGVVACTSIWAHLISAVLLGLLWISAYVGHDSGHYNVTSTKPCN
AtDES8	LYTLAFVAAMFLGVLYGVLA CTSVFAHQIAAALLGLLWISAYIGHDSGHYVIMSNKSYN
d51pu	-----
<u>b51bo</u>	-----GHDSGHYTMSSRGYN
BoDES6	-----YNIMTTKGWN
d52pu	FATLCFIAMLFAMSVYGVLFCEGVLVHLFSGCLMGFLWISQSGWIGHDAGHYMVVSDSRLN
b5cae	-----GHDSGHYMVVSDSRFN
2b5ce	ETYFLFKAI STL SIMAFAYLQYLGWYITSACLLALAWQFGWLT HEFCHQOPTKNRPLN
b5pp	PLFYIRKILETIFTILFAFYLQYHTYLLPSAILMGVAVQQLGWLI HEFAHQLFKNRYYN
	VMKLLTNVAIFAASIAIICWSKTISAVLASACMMALCFQCCGWLSHDFLHNQVFETRWN

WO 00/00593

17 / 17

PCT/DE99/01859

Fig. 16/2

HaDES?	KFAGIFIGNCIT-----GISIAWWKWT	HNAAH	IACNSLDY-----DPDLQHLPLAVS
BnDES8	KLVQLLSGNCIT-----GISIAWWKWT	HNAAH	ISCNSLDH-----DPDLQHIPPVLAVS
AtDES8	RFAQLLSGNCIT-----GISIAWWKWT	HNAAH	IACNSLDY-----DPDLQHIPPVFAVS
d51pu	KFAQVLNGNCLT-----GISIAWWKWT	HNAAH	IACNSLEY-----DPDLQHLPPVFAVS
b51bo	KFAQMLNGNCLT-----GISIAWWKWT	HNAAH	IACNSLDY-----DPDLQHLPPVFAVS
BoDES6	KFMGIFAANCLS-----GISIGWWKWN	HNAAH	IACNSLEY-----DPDLQYIPFLVVS
d52pu	KFVGIFVSNCLT-----GISIGWWKWN	HNAAH	IACNSLEY-----DPDLQYIPFLVVS
b5cae	DTISLFFGNFLQ-----GFSRDWWKDK	HNTHA	ATNVIDH-----DGDIDLAPLFAFI
2b5ce	DLASYFVGNFLQVSHIFNNGFSSGGWKECHNVHHA	ATNVVGR-----DGDLDLVPFYATV	
b5pp	EVVGIVIGNAVL-----GFSTGWWKECHN	LHHA	APNECDQTYQPIDEDIDLPLIAWS
HaDES?	SKLFNSITSVFYGRQLTFDPLARFFVS	QHYLYYPIMCVARVNLYQTILLISK---	RK
BnDES8	NKFFKSMTSRFYGRKLTFDPLARFLISYQHWSFY	PIMCVGRINLFIQTLLLLFSR---	RY
AtDES8	TKFFSSLTSRFDYRKLTFDPLARFLVSQHFYYP	PVMCFGRINLFIQTLLLLFSK---	RE
d51pu	SSFFKSLSRFDYGRBLTFDGLSRFLVSQHFYYP	PVMIFGRINLYVQTFLLLFSS---	RK
b51bo	SRFFKSLSRFDYGRBLTFDGLSRFFVSQHFISY	YPVMASAGVNLVQTFLLLFSA---	RK
BoDES6	CKFFGSLTSHFYEKRLTFDSLRSRFFVSQHWTFY	PIMCAARLNMYVQSLIMLLTK---	RN
d52pu	CKFFTSLSNSHFYGRKLTFDSLRSRFFVSQHWTFY	PVMCSARLNMYVQSLIMLLTK---	RN
b5cae	PGDLCKYKASF-----EKAILKIVPYQHL	YFTAMLPMLRFSWTSQSVQVVFENQMEY	
2b5ce	AEHLNYSQ-----DSWVMTLFRWQHVHTF	MLPFLRLSWLLQSIIFVSQMPHTHY	
b5pp	KDILATVEN-----KTFLRLIQYQHLFFMGL	LLFFARGSWLFSWRYTSTA---VLS	
HaDES?	IPDR---GLNILGTLIFWTWFP-LLVSR	LPNWP	PERVAFVLVSFCVTGIGHIQT-LNHFS
BnDES8	VPDR---ALNIAGILVFWTWFP-LLVS	FLPNWQERII	IFVFLSMAVTAIQHVQFC-LNHFA
AtDES8	VPDR---ALNFAGILVFWTWFP-LLVSC	LPNWP	PERFFVFTSFTVTALQHIQT-LNHFA
d51pu	VEDR---ALNIIGILVFWTWFP-YLVSC	LPNWN	ERVLFCFVLTALQHIQT-LNHFA
b51bo	VPDR---ALNILGILVFWTWFP-YLIS	CLPNWN	ERVLFIIVSFSVTSLOHIQT-LNHFA
BoDES6	VSYR---AQELGCLVFSIWYP-LLVSC	LPNWP	GERIMFVIASLSVTGMQVQVFS-LNHFS
d52pu	VSYR---AQELGCLVFWTWFP-LLVSC	LPNWP	GERVMSVVASLCVTGMQVQVFS-LNHFS
b5cae	KVYQRNAFWEQATIVGHAWVF-YQLF	LLPTWPLRVAYFI	ISQMGGLLIAHVTFNHNHNS
2b5ce	DYYRNTAIYEQVGLSLHAWWSL-GQY	FLPDWSTRIMFFLVSHLVGGFLLSHVVTFNHYS	
b5pp	PVDR---LLEKGTVLPHYFWFVGTAC	YLLPGWKPLVWMAVTELM	SGMMLLGFVFV-LSHNG
HaDES?	GDVYVGPP-QGDNWFEKHTRGTID	IACSSWMDWFFGGLQFQLEHHL	FPRLP
BnDES8	ADVYTGP-NGNDWFEKQTAGTLD	ISCRSYMDWFFGGLQFQLEHHL	FPRLP
AtDES8	ADVYVGPP-TGSDWFEKQAAGTID	ISCRSYMDWFFGGLQFQLEHHL	FPRLP
d51pu	ADVYVGPP-TGTNWFKEQAAGTID	ISCRSYMDWFFGGLQFQLEHHL	FPRLP
b51bo	GEVYVGAP-KGNDWFEKQTAGTID	ISCRSYMDWFFGGLQFQLEHHL	FPRLP
BoDES6	SSVYVGKP-KGNNWFEKQTDGTLD	ISCPWMDWFFGGLQFQIEHHL	FPKMP
d52pu	SSVYVGKV-KGNNWFEKQTDGTLD	ISCPWMDWFFGGLQFQIEHHL	FPKMP
b5cae	VDKYPANSRILNFAALQILTRNMT	PSFFIDWLWGGLNYQIEHHL	FPKMP
2b5ce	VEKFALSSNIMSNYACQIMTTRNMR	PGRFIDWLWGGLNYQIEHHL	FPKMP
b5pp	MEVYNSSK---EFVSAQIVSTRDI	KNIFNDWFTGGLNRQIEHHL	FPKMP
HaDES?	ICRELCKKYNLPYVSLSFYDANVT	TLKTLRTAALQARDLTNPAPQNL	WAEAFNTHG
BnDES8	VVQELCKKHNLPRYSLSWEANVT	LRTLRKAQAVQARDVTNPVLEN	LLWAEALNTHG
AtDES8	VVQELCKKHNLPRYSMSWFEANVT	INTLKTAAQARDVANPVVKNLV	WAEALNTHG
d51pu	-----	-----	-----
b51bo	IVQDYCKKHNLPRYSLSFYDANVT	TIKTLRTAALQARDLT-VVPON	LLWAEAFNTHG
BoDES6	YVIELCKKHNLPRYNASFSKANEM	TLRNTALQARDITKPLPKNLV	WAEALHTHG
d52pu	-----	-----	-----
b5cae	YVKEWCKENNLPLYVDDYFDGYAM	NLQQLK---NMAEHIQAKAA---	-----
2b5ce	LVKEFAAANGPYMVDYFTGFWE	IEQFRNIANVAAKLTCKIA---	-----
b5pp	RVEVFCKKHGLVYEDVSIATGT	CKVLKALKEVAEAAEQHATTS---	-----

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

1

Gly His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val  
 290 295 300  
 Leu Ser Leu His Trp Ala Trp Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro  
 305 310 315 320  
 Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly  
 325 330 335  
 Gly Phe Leu Leu Ser His Val Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu  
 340 345 350  
 Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln  
 355 360 365  
 Ile Met Thr Thr Arg Asn Met Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu  
 370 375 380  
 Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met  
 385 390 395 400  
 Pro Arg His Asn Leu Asn Thr Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala  
 405 410 415  
 Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe  
 420 425 430  
 Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys  
 435 440 445  
 Leu Thr Lys Lys Ile Ala  
 450

WO 00/00593

2

PCT/DE99/01859

GGA ACC GCA TGG CGC CAC CTC GAA AAC CTC CAC AAC GGC TAC CAC GTG Gly Thr Ala Trp Arg His Leu Glu Asn Leu His Asn Gly Tyr His Val 70 75 80	296
AAA GAC CAC CAC GTG TCC GAC GTG TCG CGT GAC TAC CGT CGT TTA GCC Lys Asp His His Val Ser Asp Val Ser Arg Asp Tyr Arg Arg Leu Ala 85 90 95	344
GCG GAG TTT TCC AAA CGC GGA CTC TTC GAT AAA AAA GGT CAC GTG ACT Ala Glu Phe Ser Lys Arg Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Val Thr 100 105 110	392
CTT TAC ACG CTC ACG TGC GTC GCT GCC ATG CTC GCG GCG GTT GTA TAC Leu Tyr Thr Leu Thr Cys Val Ala Ala Met Leu Ala Ala Val Val Tyr 115 120 125 130	440
GGT GTT GTT GCA TGC ACG AGC ATA TGG GCC CAC TTA ATA TCC GCC GTC Gly Val Val Ala Cys Thr Ser Ile Trp Ala His Leu Ile Ser Ala Val 135 140 145	488
TTG CTG GGC CTT CTC TGG ATA CAG AGC GCT TAC GTG GGA CAT GAC TCT Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Val Gly His Asp Ser 150 155 160	536
GGT CAT TAC AAC GTG ACG TCA ACG AAG CCG TGT AAT AAA CTC GTC CAG Gly His Tyr Asn Val Thr Ser Thr Lys Pro Cys Asn Lys Leu Val Gln 165 170 175	584
CTT CTG TCT GGT AAC TGC ATC ACC GGG ATA TCG ATC GCG TGG TGG AAA Leu Leu Ser Gly Asn Cys Ile Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys 180 185 190	632
TGG ACG CAT AAC GCT CAC CAT ATC TCT TGT AAT AGT CTT GAC CAC GAT Trp Thr His Asn Ala His His Ile Ser Cys Asn Ser Leu Asp His Asp 195 200 205 210	680
CCT GAT CTC CAG CAC ATC CCT GTC TTA GCG GTC TCC AAC AAG TTC TTT Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Leu Ala Val Ser Asn Lys Phe Phe 215 220 225	728
AAG TCG ATG ACG TCA CGT TTC TAT GGG AGG AAG TTG ACG TTC GAT CCA Lys Ser Met Thr Ser Arg Phe Tyr Gly Arg Lys Leu Thr Phe Asp Pro 230 235 240	776
CTA GCT CGA TTC TTG ATC AGC TAC CAA CAC TGG TCG TTT TAT CCA ATC Leu Ala Arg Phe Leu Ile Ser Tyr Gln His Trp Ser Phe Tyr Pro Ile 245 250 255	824
ATG TGT GTG GGG AGA ATC AAT CTC TTT ATC CAA ACG TTA CTT TTG CTA Met Cys Val Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr Leu Leu Leu Leu 260 265 270	872
TTC TCG AGA CGT TAC GTT CCT GAT CGA GCC TTG AAC ATA GCT GGG ATT Phe Ser Arg Arg Tyr Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Ile Ala Gly Ile 275 280 285 290	920
CTT GTT TTC TGG ACG TGG TTT CCT CTT TTA GTA TCC TTC CTA CCA AAC Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Phe Leu Pro Asn 295 300 305	968



WO 00/00593

3

PCT/DE99/01859

TGG CAA GAG AGG ATC ATC TTT GTC TTT TTA AGC ATG GCC GTC ACG GCG Trp Gln Glu Arg Ile Ile Phe Val Phe Leu Ser Met Ala Val Thr Ala 310 315 320	1016
ATT CAG CAC GTT CAG TTC TGT TTA AAC CAT TTT GCG GCA GAT GTT TAC Ile Gln His Val Gln Phe Cys Leu Asn His Phe Ala Ala Asp Val Tyr 325 330 335	1064
ACC GGT CCG CCT AAT GGG AAC GAT TGG TTT GAG AAG CAA ACA GCT GGT Thr Gly Pro Pro Asn Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Ala Gly 340 345 350	1112
ACG CTT GAT ATA TCG TGT AGG TCG TAT ATG GAT TGG TTC TTT GGC GGG Thr Leu Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly 355 360 365 370	1160
TTG CAG TTT CAG CTA GAG CAT CAT CTG TTC CCT AGG CTA CCG CGT TGC Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro Arg Cys 375 380 385	1208
CAT CTC AGG GGA GTT TCG CCT GTG GTT CAG GAG CTT TGT AAG AAG CAT His Leu Arg Gly Val Ser Pro Val Val Gln Glu Leu Cys Lys Lys His 390 395 400	1256
AAT CTA CCG TAT AGG AGT CTT TCG TGG TGG GAG GCT AAT GTG TGG ACG Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Leu Ser Trp Trp Glu Ala Asn Val Trp Thr 405 410 415	1304
CTC AGG ACT CTG AGG AAA GCG GCG GTT CAA GCT AGA GAT GTG ACT AAT Leu Arg Thr Leu Arg Lys Ala Ala Val Gln Ala Arg Asp Val Thr Asn 420 425 430	1352
CCT GTG TTG GAG AAT TTG CTA TGG GAA GCT CTG AAT ACT CAT GGC Pro Val Leu Glu Asn Leu Leu Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly 435 440 445	1397
TAGAAAAAAA AACTGAACAG TACAGATCGG TTTTGGTTTCG GTTTTGCATG GTGGTTAATT	1457
TCGTTTGTTA TGTACTTTTC TAGTGGAAGA GATGTGTAA GTTTTGT TTTTGTATG	1517
AACTCATCAC TTGATCTCAT CAAAATATG TACTTAATTT CATTTTGTG ATCAGTTATT	1577
ATAATGTTTC TGGCTCC	1594

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 449 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Glu	Gln	Thr	Lys	Lys	Arg	Phe	Ile	Thr	Ser	Asp	Asp	Leu	Lys
1					5				10					15	

WO 00/00593

4

PCT/DE99/01859

Lys His Asn Gln Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val  
20 25 30

Tyr Asp Val Ser His Trp Val Lys Ser His Pro Gly Gly Glu Ala Ala  
35 40 45

Ile Leu Asn Leu Ala Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Tyr  
50 55 60

His Pro Gly Thr Ala Trp Arg His Leu Glu Asn Leu His Asn Gly Tyr  
65 70 75 80

His Val Lys Asp His His Val Ser Asp Val Ser Arg Asp Tyr Arg Arg  
85 90 95

Leu Ala Ala Glu Phe Ser Lys Arg Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His  
100 105 110

Val Thr Leu Tyr Thr Leu Thr Cys Val Ala Ala Met Leu Ala Ala Val  
115 120 125

Val Tyr Gly Val Val Ala Cys Thr Ser Ile Trp Ala His Leu Ile Ser  
130 135 140

Ala Val Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Val Gly His  
145 150 155 160

Asp Ser Gly His Tyr Asn Val Thr Ser Thr Lys Pro Cys Asn Lys Leu  
165 170 175

Val Gln Leu Leu Ser Gly Asn Cys Ile Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp  
180 185 190

Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Ile Ser Cys Asn Ser Leu Asp  
195 200 205

His Asp Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Leu Ala Val Ser Asn Lys  
210 215 220

Phe Phe Lys Ser Met Thr Ser Arg Phe Tyr Gly Arg Lys Leu Thr Phe  
225 230 235 240

Asp Pro Leu Ala Arg Phe Leu Ile Ser Tyr Gln His Trp Ser Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ile Met Cys Val Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr Leu Leu  
260 265 270

Leu Leu Phe Ser Arg Arg Tyr Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Ile Ala  
275 280 285

Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Phe Leu  
290 295 300

Pro Asn Trp Gln Glu Arg Ile Ile Phe Val Phe Leu Ser Met Ala Val  
305 310 315 320

Thr Ala Ile Gln His Val Gln Phe Cys Leu Asn His Phe Ala Ala Asp  
325 330 335

WO 00/00593

5

PCT/DE99/01859

Val Tyr Thr Gly Pro Pro Asn Gly 340 Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr 350  
 Ala Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp Phe Phe 355 360 365  
 Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro 370 375 380  
 Arg Cys His Leu Arg Gly Val Ser Pro Val Val Gln Glu Leu Cys Lys 385 390 395 400  
 Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Leu Ser Trp Trp Glu Ala Asn Val 405 410 415  
 Trp Thr Leu Arg Thr Leu Arg Lys Ala Ala Val Gln Ala Arg Asp Val 420 425 430  
 Thr Asn Pro Val Leu Glu Asn Leu Leu Trp Glu Ala Leu Asn Thr His 435 440 445  
 Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1678 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 172..1518

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAGACAGAGA GAGATTCAAA AATCCGATTC CAGATCCATT CCTGGGCAAA CAAAGGTTGG 60  
 TGTTTCTCTA ATCTCAAAGC TTTTCTCAAA TTCGAAAAA GCAAATCGTG GGAAGAGATT 120  
 CATCTTCTCT CTGTGCGTTC ATCGGATCTC GGAGCTTTTG GTTCGTCGTC A ATG GCG 177  
 Met Ala 450  
 GAA GAG ACG GAG AAA AAG TAC ATT ACG AAC GAA GAT CTT AAA AAA CAC 225  
 Glu Glu Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Thr Asn Glu Asp Leu Lys Lys His 455 460 465  
 AAC AAA TCT GGA GAT CTA TGG ATC GCG ATT CAA GGC AAG GTC TAC AAC 273  
 Asn Lys Ser Gly Asp Leu Trp Ile Ala Ile Gln Gly Lys Val Tyr Asn 470 475 480  
 GTC TCC GAT TGG ATT AAA ACT CAT CCC GGA GGC GAC ACG GTG ATT CTC 321  
 Val Ser Asp Trp Ile Lys Thr His Pro Gly Gly Asp Thr Val Ile Leu 485 490 495

WO 00/00593

6

PCT/DE99/01859

AAT CTC GTT GGT CAA GAC GTC ACC	GAT GCT TTC ATC GCA TTT CAT CCC	
369		
Asn Leu Val Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Phe His Pro		
500	505 510 515	
GGA ACC GCT TGG CAC CAT CTC GAC CAT CTC TTC ACC GGT TAC CAC ATC		417
Gly Thr Ala Trp His His Leu Asp His Leu Phe Thr Gly Tyr His Ile		
520 525 530		
AGA GAT TTC CAA GTC TCC GAA GTC TCA CGC GAT TAC CGT CGT ATG GCT		465
Arg Asp Phe Gln Val Ser Glu Val Ser Arg Asp Tyr Arg Arg Met Ala		
535 540 545		
GCC GAG TTT CGT AAA CTC GGT CTC TTC GAA AAC AAA GGT CAC GTT ACT		513
Ala Glu Phe Arg Lys Leu Gly Leu Phe Glu Asn Lys Gly His Val Thr		
550 555 560		
CTC TAC ACT CTA GCC TTC GTC GCC GCC ATG TTC CTC GGA GTT CTC TAC		561
Leu Tyr Thr Leu Ala Phe Val Ala Ala Met Phe Leu Gly Val Leu Tyr		
565 570 575		
GGT GTT TTG GCT TGT ACC TCC GTC TTC GCT CAC CAA ATC GCC GCC GCG		609
Gly Val Leu Ala Cys Thr Ser Val Phe Ala His Gln Ile Ala Ala Ala		
580 585 590 595		
CTT CTC GGT CTC CTC TGG ATC CAG AGC GCT TAC ATA GGT CAC GAT TCT		657
Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Ile Gly His Asp Ser		
600 605 610		
GGT CAT TAC GTT ATC ATG TCG AAC AAA TCT TAT AAC AGA TTC GCT CAG		705
Gly His Tyr Val Ile Met Ser Asn Lys Ser Tyr Asn Arg Phe Ala Gln		
615 620 625		
CTT CTC TCC GGT AAC TGT CTC ACC GGA ATC TCA ATC GCG TGG TGG AAA		753
Leu Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys		
630 635 640		
TGG ACT CAC AAT GCT CAT CAT CTA GCT TGT AAC AGC CTC GAT TAC GAT		801
Trp Thr His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr Asp		
645 650 655		
CCA GAT CTA CAA CAC ATC CCT GTC TTC GCC GTC TCC ACC AAA TTC TTC		849
Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Phe Ala Val Ser Thr Lys Phe Phe		
660 665 670 675		
TCC TCA TTG ACC TCG AGA TTC TAC GAT CGG AAA CTC ACG TTT GAT CCA		897
Ser Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Arg Lys Leu Thr Phe Asp Pro		
680 685 690		
GTC GCG AGA TTC TTA GTC AGC TAT CAA CAC TTT ACT TAT TAT CCA GTT		945
Val Ala Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr Tyr Tyr Pro Val		
695 700 705		
ATG TGC TTT GGA AGA ATC AAT CTC TTC ATT CAA ACG TTT CTC TTG CTC		993
Met Cys Phe Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr Phe Leu Leu Leu		
710 715 720		
TTC TCC AAA CGT GAA GTA CCA GAT CGT GCT TTA AAC TTC GCC GGA ATC		1041
Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Phe Ala Gly Ile		

WO 00/00593

PCT/DE99/01859

7

725	730	735	
TTA GTC TTC TGG ACT TGG TTC CCA CTC TTA GTC TCA TGT CTA CCA AAC Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro Asn 740 745 750 755			1089
TGG CCT GAG AGA TTC TTC TTC GTC TTC ACA AGC TTC ACC GTC ACG GCG Trp Pro Glu Arg Phe Phe Phe Val Phe Thr Ser Phe Thr Val Thr Ala 760 765 770			1137
CTT CAA CAC ATT CAA TTC ACG CTT AAC CAT TTC GCT GCT GAT GTC TAC Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala Ala Asp Val Tyr 775 780 785			1185
GTT GGT CCA CCC ACC GGT AGC GAC TGG TTC GAG AAG CAA GCG GCG GGA Val Gly Pro Pro Thr Gly Ser Asp Trp Phe Glu Lys Gln Ala Ala Gly 790 795 800			1233
ACA ATC GAT ATC TCT TGT AGA TCA TAC ATG GAT TGG TTC TTT GGT GGA Thr Ile Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly 805 810 815			1281
TTA CAG TTT CAG CTT GAG CAT CAT TTG TTC CCT CGC TTA CCT CGT TGC Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro Arg Cys 820 825 830 835			1329
CAT CTC CGG AAA GTT TCT CCG GTG GTT CAA GAG CTT TGC AAG AAG CAT His Leu Arg Lys Val Ser Pro Val Val Gln Glu Leu Cys Lys Lys His 840 845 850			1377
AAT CTT CCG TAT AGG AGT ATG TCG TGG TTT GAA GCA AAT GTG TTG ACC Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Met Ser Trp Phe Glu Ala Asn Val Leu Thr 855 860 865			1425
ATT AAC ACT TTG AAG ACA GCA GCT TAT CAA GCT AGA GAC GTG GCT AAT Ile Asn Thr Leu Lys Thr Ala Ala Tyr Gln Ala Arg Asp Val Ala Asn 870 875 880			1473
CCG GTG GTT AAG AAC TTG GTT TGG GAA GCT TTG AAT ACT CAT GGC Pro Val Val Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly 885 890 895			1518
TAAATGATTT TAATCAAAAC AAAATATGCT TTTGTTTGGG TTAAATTTGA TGTGTTGTTT			1578
TTATGCTTTA TTGAATCTTT GAATTTCGTT TTGTTACTTA CTTACATGGA AGAGACGTTT			1638
TAGATCGAAA TTGAATCGAG ATTTGATTTT TTTATTAGAC			1678

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 449 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

WO 00/00593

8

PCT/DE99/01859

Met Ala Glu Glu Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Thr Asn Glu Asp Leu Lys  
1 5 10 15  
Lys His Asn Lys Ser Gly Asp Leu Trp Ile Ala Ile Gln Gly Lys Val  
20 25 30  
Tyr Asn Val Ser Asp Trp Ile Lys Thr His Pro Gly Gly Asp Thr Val  
35 40 45  
Ile Leu Asn Leu Val Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Phe  
50 55 60  
His Pro Gly Thr Ala Trp His His Leu Asp His Leu Phe Thr Gly Tyr  
65 70 75 80  
His Ile Arg Asp Phe Gln Val Ser Glu Val Ser Arg Asp Tyr Arg Arg  
85 90 95  
Met Ala Ala Glu Phe Arg Lys Leu Gly Leu Phe Glu Asn Lys Gly His  
100 105 110  
Val Thr Leu Tyr Thr Leu Ala Phe Val Ala Ala Met Phe Leu Gly Val  
115 120 125  
Leu Tyr Gly Val Leu Ala Cys Thr Ser Val Phe Ala His Gln Ile Ala  
130 135 140  
Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu Trp Ile Gln Ser Ala Tyr Ile Gly His  
145 150 155 160  
Asp Ser Gly His Tyr Val Ile Met Ser Asn Lys Ser Tyr Asn Arg Phe  
165 170 175  
Ala Gln Leu Leu Ser Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp  
180 185 190  
Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser Leu Asp  
195 200 205  
Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His Ile Pro Val Phe Ala Val Ser Thr Lys  
210 215 220  
Phe Phe Ser Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Arg Lys Leu Thr Phe  
225 230 235 240  
Asp Pro Val Ala Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr Tyr Tyr  
245 250 255  
Pro Val Met Cys Phe Gly Arg Ile Asn Leu Phe Ile Gln Thr Phe Leu  
260 265 270  
Leu Leu Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Phe Ala  
275 280 285  
Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu  
290 295 300  
Pro Asn Trp Pro Glu Arg Phe Phe Phe Val Phe Thr Ser Phe Thr Val  
305 310 315 320  
Thr Ala Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala Ala Asp

WO 00/00593

9

PCT/DE99/01859

	325		330		335
Val Tyr Val Gly Pro Pro Thr Gly Ser Asp Trp Phe Glu Lys Gln Ala	340		345		350
Ala Gly Thr Ile Asp Ile Ser Cys Arg Ser Tyr Met Asp Trp Phe Phe	355		360		365
Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro	370		375		380
Arg Cys His Leu Arg Lys Val Ser Pro Val Val Gln Glu Leu Cys Lys	385		390		395
Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Met Ser Trp Phe Glu Ala Asn Val	405		410		415
Leu Thr Ile Asn Thr Leu Lys Thr Ala Ala Tyr Gln Ala Arg Asp Val	420		425		430
Ala Asn Pro Val Val Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His	435		440		445
Gly					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

His Asp Ala Gly His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Asp Ser Gly His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

WO 00/00593

10.

PCT/DE99/01859

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

His Asn Ala His His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gln Leu Glu His His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
  - (B) LAGE:3
  - (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa = beliebige Aminosäure"

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
  - (B) LAGE:4
  - (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa = beliebige Aminosäure"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Ala Tyr Xaa Xaa His Asp Ala Gly His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:



WO 00/00593

11

PCT/DE99/01859

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
  - (B) LAGE:3
  - (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa = beliebige Aminosäure"

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
  - (B) LAGE:4
  - (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa = beliebige Aminosäure"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Ala Tyr Xaa Xaa His Asp Ser Gly His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
  - (B) LAGE:3
  - (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Xaa = beliebige Aminosäure"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Ala Tyr Xaa Gly His Asp Ala Gly His  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Thr His Asn Ala His His  
1 5

WO 00/00593

12

PCT/DE99/01859

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Phe Gly Gly Leu Gln Phe  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Trp Trp Lys Trp Thr  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GSNTGGTGGA ARTGG

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

WO 00/00593

13

PCT/DE99/01859

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GGRAANARRT GRTG

14

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Ala Trp Trp Lys Trp  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Trp Trp Lys Trp  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

His His Leu Phe Pro  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

WO 00/00593

14

PCT/DE99/01859

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TTATGCGTCC ATTTCCACCA

20

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GATCTAGACT CGAGGTCGAC T

21

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TTCTTTGGCG GGTTCAGTT

20

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

GATCTAGACT CGAGGTCGAC T

21

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare

WO 00/00593

15

PCT/DE99/01859

- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

AACCATCTCT GTTCAAC

18

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

CAAGTGATGA TGAGTTAC

18

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

CCGGTACCAT GTCGAGCAG ACAAAG

26

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CCGAATTCCT AGCCATGAGT ATTCAGA

27

WO 00/00593

16

PCT/DE99/01859

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GCGATTCAAG GCAAGGTCTA C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

TTAGCCATGA GTATTCAAAG C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

CCGGTACCAT GCGGAAGAG ACGGAG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

WO 00/00593

17

PCT/DE99/01859

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

CCGAATTCTT AGCCATGAGT ATTCAAAGC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

CACAATCCCA CTATCCTT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GGAGCTTTGT AAGAAGCAT

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

GGAATCTCAA TCGCGTGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1606 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

WO 00/00593

18

PCT/DE99/01859

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:88..1461

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GGGGGGGGGG GGGGGGACCA CATCAACACT CTCCGATCGA TTCCCCCTCG CCGGACTTTT	60
ACATATCCTC CGGTGAACATC ATCGTCG ATG GTG TCG CCA TCC ATA GAA GTG	111
Met Val Ser Pro Ser Ile Glu Val	
450 455	
TTG AAT TCA ATT GCT GAT GGA AAA AAA TAC ATA ACA TCA AAA GAG TTA	159
Leu Asn Ser Ile Ala Asp Gly Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Lys Glu Leu	
460 465 470	
AAG AAG CAT AAC AAC CCT AAT GAC CTT TGG ATC TCA ATT TTG GGC AAA	207
Lys Lys His Asn Asn Pro Asn Asp Leu Trp Ile Ser Ile Leu Gly Lys	
475 480 485	
GTT TAC AAC GTT ACA GAA TGG GCT AAA GAG CAT CCG GGT GGC GAT GCC	255
Val Tyr Asn Val Thr Glu Trp Ala Lys Glu His Pro Gly Gly Asp Ala	
490 495 500 505	
CCG TTG ATT AAT CTC GCG GGC CAG GAT GTA ACT GAC GCA TTT ATC GCA	303
Pro Leu Ile Asn Leu Ala Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala	
510 515 520	
TTT CAT CCC GGT ACT GCG TGG AAG CAT CTA GAC AAA CTA TTC ACC GGG	351
Phe His Pro Gly Thr Ala Trp Lys His Leu Asp Lys Leu Phe Thr Gly	
525 530 535	
TAT CAC TTA AAA GAT TAC CAG GTT TCT GAC ATT TCT AGA GAC TAC CGG	399
Tyr His Leu Lys Asp Tyr Gln Val Ser Asp Ile Ser Arg Asp Tyr Arg	
540 545 550	
AAA CTC GCT TCA GAG TTT GCA AAA GCG GGT ATG TTT GAG AAG AAA GGT	447
Lys Leu Ala Ser Glu Phe Ala Lys Ala Gly Met Phe Glu Lys Lys Gly	
555 560 565	
CAC GGT GTA ATT TAC TCA CTT TGT TTC GTG TCG CTA CTG CTT TCC GCT	495
His Gly Val Ile Tyr Ser Leu Cys Phe Val Ser Leu Leu Leu Ser Ala	
570 575 580 585	
TGT GTG TAT GGC GTG TTA TAT TCC GGA AGC TTC TGG ATT CAT ATG CTT	543
Cys Val Tyr Gly Val Leu Tyr Ser Gly Ser Phe Trp Ile His Met Leu	
590 595 600	
TCG GGG GCG ATA TTG GGA TTA GCA TGG ATG CAA ATT GCC TAT TTG GGT	591
Ser Gly Ala Ile Leu Gly Leu Ala Trp Met Gln Ile Ala Tyr Leu Gly	
605 610 615	
CAT GAC GCG GGT CAT TAC CAA ATG ATG GCG ACC CGC GGG TGG AAC AAG	639
His Asp Ala Gly His Tyr Gln Met Met Ala Thr Arg Gly Trp Asn Lys	
620 625 630	
TTT GCC GGA ATA TTT ATC GGG AAT TGT ATA ACC GGA ATA AGC ATC GCG	687
Phe Ala Gly Ile Phe Ile Gly Asn Cys Ile Thr Gly Ile Ser Ile Ala	
635 640 645	



WO 00/00593

19

PCT/DE99/01859

TGG TGG AAA TGG ACG CAT AAC GCA	CAT CAC ATC GCT TGT AAC AGT CTT	
735		
Trp Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu		
650	655 660 665	
GAT TAT GAT CCT GAT CTT CAG CAT TTA CCG ATG TTA GCC GTT TCT TCC		783
Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His Leu Pro Met Leu Ala Val Ser Ser		
670	675 680	
AAG CTT TTT AAC TCA ATA ACT TCT GTT TTC TAT GGG AGA CAG TTG ACC		831
Lys Leu Phe Asn Ser Ile Thr Ser Val Phe Tyr Gly Arg Gln Leu Thr		
685	690 695	
TTT GAC CCG TTA GCC CGG TTC TTC GTG AGC TAC CAG CAT TAC TTA TAT		879
Phe Asp Pro Leu Ala Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Tyr Leu Tyr		
700	705 710	
TAC CCG ATC ATG TGT GTG GCC CGG GTC AAC CTC TAT TTA CAA ACA ATC		927
Tyr Pro Ile Met Cys Val Ala Arg Val Asn Leu Tyr Leu Gln Thr Ile		
715	720 725	
CTG TTG CTG ATT TCA AAA CGA AAG ATT CCC GAC AGA GGT TTA AAC ATA		975
Leu Leu Leu Ile Ser Lys Arg Lys Ile Pro Asp Arg Gly Leu Asn Ile		
730	735 740 745	
CTC GGA ACC CTA ATC TTC TGG ACG TGG TTT CCG TTA CTT GTT TCT CGC		1023
Leu Gly Thr Leu Ile Phe Trp Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Arg		
750	755 760	
TTA CCG AAC TGG CCC GAA CGC GTG GCG TTT GTG TTG GTT AGC TTC TGT		1071
Leu Pro Asn Trp Pro Glu Arg Val Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Cys		
765	770 775	
GTA ACG GGT ATA CAA CAT ATT CAG TTT ACA CTG AAC CAT TTT TCT GGG		1119
Val Thr Gly Ile Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ser Gly		
780	785 790	
GAT GTT TAC GTG GGC CCG CCA AAA GGA GAC AAT TGG TTC GAG AAA CAA		1167
Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys Gly Asp Asn Trp Phe Glu Lys Gln		
795	800 805	
ACG CGT GGG ACC ATC GAT ATC GCG TGT TCT TCT TGG ATG GAT TGG TTT		1215
Thr Arg Gly Thr Ile Asp Ile Ala Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp Phe		
810	815 820 825	
TTC GGA GGT TTA CAG TTT CAA CTT GAG CAC CAT TTG TTT CCT AGG TTG		1263
Phe Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu		
830	835 840	
CCA CGG TGT CAC TTG AGG TCG ATT TCT CCT ATA TGT AGA GAA CTC TGC		1311
Pro Arg Cys His Leu Arg Ser Ile Ser Pro Ile Cys Arg Glu Leu Cys		
845	850 855	
AAG AAA TAT AAC TTA CCT TAT GTG AGT TTG TCG TTT TAT GAT GCG AAT		1359
Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr Val Ser Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Asn		
860	865 870	
GTA ACG ACC TTG AAG ACG CTT AGG ACA GCG GCT CTA CAG GCA CGT GAC		1407
Val Thr Thr Leu Lys Thr Leu Arg Thr Ala Ala Leu Gln Ala Arg Asp		
875	880 885	

WO 00/00593

20

PCT/DE99/01859

CTT ACG AAC CCG GCC CCA CAG AAT TTA GCT TGG GAA GCT TTC AAC ACC 1455  
 Leu Thr Asn Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ala Trp Glu Ala Phe Asn Thr  
 890 895 900 905

CAT GGT TGAAGCTTCT ATCATCTATG TTGGTACTCA TCTCGGCTAC TTTGTGTAAA 1511  
 His Gly

AGGCTTTGAG CATTTTCTG GGCTTTTATG TATCTTAAAA CTAAATATGG ACTATGATTA 1571

TTTATATATT TTGGATTATT AAAAAAAAAA AAAAA 1606

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 458 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

Met Val Ser Pro Ser Ile Glu Val Leu Asn Ser Ile Ala Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Lys Tyr Ile Thr Ser Lys Glu Leu Lys Lys His Asn Asn Pro Asn Asp  
 20 25 30

Leu Trp Ile Ser Ile Leu Gly Lys Val Tyr Asn Val Thr Glu Trp Ala  
 35 40 45

Lys Glu His Pro Gly Gly Asp Ala Pro Leu Ile Asn Leu Ala Gly Gln  
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Phe His Pro Gly Thr Ala Trp Lys  
 65 70 75 80

His Leu Asp Lys Leu Phe Thr Gly Tyr His Leu Lys Asp Tyr Gln Val  
 85 90 95

Ser Asp Ile Ser Arg Asp Tyr Arg Lys Leu Ala Ser Glu Phe Ala Lys  
 100 105 110

Ala Gly Met Phe Glu Lys Lys Gly His Gly Val Ile Tyr Ser Leu Cys  
 115 120 125

Phe Val Ser Leu Leu Leu Ser Ala Cys Val Tyr Gly Val Leu Tyr Ser  
 130 135 140

Gly Ser Phe Trp Ile His Met Leu Ser Gly Ala Ile Leu Gly Leu Ala  
 145 150 155 160

Trp Met Gln Ile Ala Tyr Leu Gly His Asp Ala Gly His Tyr Gln Met  
 165 170 175

Met Ala Thr Arg Gly Trp Asn Lys Phe Ala Gly Ile Phe Ile Gly Asn  
 180 185 190

Cys Ile Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys Trp Thr His Asn Ala

WO 00/00593

21

PCT/DE99/01859

195                      200                      205  
 His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His  
   210                                      215                                      220  
 Leu Pro Met Leu Ala Val Ser Ser Lys Leu Phe Asn Ser Ile Thr Ser  
   225                                      230                                      235                                      240  
 Val Phe Tyr Gly Arg Gln Leu Thr Phe Asp Pro Leu Ala Arg Phe Phe  
                                     245                                      250                                      255  
 Val Ser Tyr Gln His Tyr Leu Tyr Tyr Pro Ile Met Cys Val Ala Arg  
                                     260                                      265                                      270  
 Val Asn Leu Tyr Leu Gln Thr Ile Leu Leu Leu Ile Ser Lys Arg Lys  
                                     275                                      280                                      285  
 Ile Pro Asp Arg Gly Leu Asn Ile Leu Gly Thr Leu Ile Phe Trp Thr  
                                     290                                      295                                      300  
 Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser Arg Leu Pro Asn Trp Pro Glu Arg Val  
   305                                      310                                      315                                      320  
 Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Cys Val Thr Gly Ile Gln His Ile Gln  
                                     325                                      330                                      335  
 Phe Thr Leu Asn His Phe Ser Gly Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Lys  
                                     340                                      345                                      350  
 Gly Asp Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Arg Gly Thr Ile Asp Ile Ala  
                                     355                                      360                                      365  
 Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu  
                                     370                                      375                                      380  
 Glu His His Leu Phe Pro Arg Leu Pro Arg Cys His Leu Arg Ser Ile  
   385                                      390                                      395                                      400  
 Ser Pro Ile Cys Arg Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr Val  
                                     405                                      410                                      415  
 Ser Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Asn Val Thr Thr Leu Lys Thr Leu Arg  
                                     420                                      425                                      430  
 Thr Ala Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr Asn Pro Ala Pro Gln Asn  
                                     435                                      440                                      445  
 Leu Ala Trp Glu Ala Phe Asn Thr His Gly  
                                     450                                      455

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 448 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

WO 00/00593

22

PCT/DE99/01859

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn  
 1 5 10 15  
 His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr  
 20 25 30  
 Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His  
 50 55 60  
 Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu  
 85 90 95  
 Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile  
 100 105 110  
 Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val  
 115 120 125  
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Met Gly Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp  
 145 150 155 160  
 Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met  
 165 170 175  
 Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp  
 180 185 190  
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr  
 195 200 205  
 Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Cys Lys Phe  
 210 215 220  
 Phe Gly Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro  
 245 250 255  
 Ile Met Cys Ala Ala Arg Leu Asn Met Tyr Val Gln Ser Leu Ile Met  
 260 265 270  
 Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly  
 275 280 285  
 Cys Leu Val Phe Ser Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro  
 290 295 300

WO 00/00593

23

PCT/DE99/01859

Thr Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Ile Ala Ser Leu Ser Val  
 305 310 315 320  
 Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val  
 325 330 335  
 Tyr Val Gly Lys Pro Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Asp  
 340 345 350  
 Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp Phe His Gly  
 355 360 365  
 Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Lys Met Pro Arg  
 370 375 380  
 Cys Asn Leu Arg Lys Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys  
 385 390 395 400  
 His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met  
 405 410 415  
 Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr  
 420 425 430  
 Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly  
 435 440 445

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 224 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

Gly His Asp Ser Gly His Tyr Thr Met Met Ser Ser Arg Gly Tyr Asn  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Ala Gln Val Leu Asn Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Ala Trp Trp Lys Trp Thr His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser  
 35 40 45  
 Leu Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln His Leu Pro Val Phe Ala Val Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Phe Phe Lys Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Gly Arg Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Phe Asp Gly Leu Ser Arg Phe Leu Val Ser Tyr Gln His Phe Thr  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Pro Val Met Ile Phe Gly Arg Ile Asn Leu Tyr Val Gln Thr  
 100 105 110

WO 00/00593

24

PCT/DE99/01859

Phe Leu Leu Leu Phe Ser Ser Arg Lys Val Glu Asp Arg Ala Leu Asn  
115 120 125  
Ile Ile Gly Ile Leu Val Phe Trp Thr Trp Phe Pro Tyr Leu Val Ser  
130 135 140  
Cys Leu Pro Asn Trp Asn Glu Arg Val Leu Phe Val Leu Thr Cys Phe  
145 150 155 160  
Ser Val Thr Ala Leu Gln His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala  
165 170 175  
Ala Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Thr Gly Thr Asn Trp Phe Glu Lys  
180 185 190  
Gln Ala Ala Gly Thr Ile Asp Ile Ser Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp  
195 200 205  
Phe Phe Gly Gly Leu Gln Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Gln  
210 215 220

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 284 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

Tyr Asn Ile Met Thr Thr Lys Gly Trp Asn Lys Phe Ala Gln Met Leu  
1 5 10 15  
Asn Gly Asn Cys Leu Thr Gly Ile Ser Ile Ala Trp Trp Lys Trp Thr  
20 25 30  
His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp  
35 40 45  
Leu Gln His Leu Pro Val Phe Ala Val Ser Ser Arg Phe Phe Lys Ser  
50 55 60  
Leu Thr Ser Gln Phe Tyr Gly Arg Glu Leu Thr Phe Asp Arg Leu Ser  
65 70 75 80  
Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Ile Ser Tyr Tyr Pro Val Met Ala  
85 90 95  
Ser Ala Gly Val Asn Leu Tyr Val Gln Thr Phe Leu Leu Leu Phe Ser  
100 105 110  
Ala Arg Lys Val Pro Asp Arg Ala Leu Asn Ile Leu Gly Ile Leu Val  
115 120 125  
Phe Trp Thr Trp Phe Pro Tyr Leu Ile Ser Cys Leu Pro Asn Trp Asn  
130 135 140

WO 00/00593

25

PCT/DE99/01859

Glu Arg Val Leu Phe Ile Ile Val Ser Phe Ser Val Thr Ser Leu Gln  
 145 150 155 160  
 His Ile Gln Phe Thr Leu Asn His Phe Ala Gly Glu Val Tyr Val Gly  
 165 170 175  
 Ala Pro Lys Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Ala Gly Thr Ile  
 180 185 190  
 Asp Ile Ser Cys Ser Ser Trp Met Asp Trp Phe Phe Gly Gly Leu Gln  
 195 200 205  
 Phe Gln Leu Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro Arg Cys Gln Leu  
 210 215 220  
 Arg Asn Ile Ser Pro Ile Val Gln Asp Tyr Cys Lys Lys His Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Phe Arg Ser Leu Ser Phe Phe Gly Ala Asn Val Thr Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Thr Leu Arg Thr Ala Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr Val Val Pro  
 260 265 270  
 Gln Asn Leu Leu Trp Glu Ala Phe Asn Thr His Gly  
 275 280

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 222 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

Gly His Asp Ser Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Val Gly Ile Phe Val Ser Asn Cys Ile Ser Gly Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His Leu Ala Cys Asn Ser  
 35 40 45  
 Leu Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser  
 50 55 60  
 Cys Lys Phe Phe Thr Ser Leu Asn Ser His Phe Tyr Gly Lys Arg Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Phe Asp Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Tyr Pro Val Met Cys Ser Ala Arg Leu Asn Met Phe Leu Gln Ser  
 100 105 110

WO 00/00593

26

PCT/DE99/01859

Ile Ile Met Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu  
 115 120 125  
 Leu Leu Gly Leu Leu Val Phe Leu Thr Trp Phe Pro Leu Leu Val Ser  
 130 135 140  
 Cys Leu Pro Asn Trp Gly Glu Arg Val Met Ser Val Val Ala Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Cys Val Thr Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser  
 165 170 175  
 Ser Ser Val Tyr Val Gly Lys Val Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys  
 180 185 190  
 Gln Thr Asp Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp  
 195 200 205  
 Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe  
 210 215 220

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 473 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

Met Val Val Asp Lys Asn Ala Ser Gly Leu Arg Met Lys Val Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Leu Val Lys Lys His Pro Gly Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Glu Gln Tyr Ser Ile Pro Pro Leu Asn Lys Asn Ile Glu  
 35 40 45  
 Thr Arg Gly Ile Ile Thr Thr Arg Gly Ser Ser Asn Ala Leu Asp Ile  
 50 55 60  
 Leu Tyr Phe Tyr Arg Asn Ser Asp Ala Thr His Ile Phe His Ala Phe  
 65 70 75 80  
 His Glu Gly Ser Ser Gln Ala Tyr Lys Gln Leu Asp Leu Leu Lys Lys  
 85 90 95  
 His Gly Glu His Asp Glu Phe Leu Glu Lys Gln Leu Glu Lys Arg Leu  
 100 105 110  
 Asp Lys Val Asp Ile Asn Val Ser Ala Tyr Asp Val Ser Val Ala Gln  
 115 120 125  
 Glu Lys Lys Met Val Glu Ser Phe Glu Lys Leu Arg Gln Lys Leu His  
 130 135 140



WO 00/00593

27

PCT/DE99/01859

Asp Asp Gly Leu Met Lys Ala Asn Glu Thr Tyr Phe Leu Phe Lys Ala  
145 150 155 160

Ile Ser Thr Leu Ser Ile Met Ala Phe Ala Phe Tyr Leu Gln Tyr Leu  
165 170 175

Gly Trp Tyr Ile Thr Ser Ala Cys Leu Leu Ala Leu Ala Trp Gln Gln  
180 185 190

Phe Gly Trp Leu Thr His Glu Phe Cys His Gln Gln Pro Thr Lys Asn  
195 200 205

Arg Pro Leu Asn Asp Thr Ile Ser Leu Phe Phe Gly Asn Phe Leu Gln  
210 215 220

Gly Phe Ser Arg Asp Trp Trp Lys Asp Lys His Asn Thr His His Ala  
225 230 235 240

Ala Thr Asn Val Ile Asp His Asp Gly Asp Ile Asp Leu Ala Pro Leu  
245 250 255

Phe Ala Phe Ile Pro Gly Asp Leu Cys Lys Tyr Lys Ala Ser Phe Glu  
260 265 270

Lys Ala Ile Leu Lys Ile Val Pro Tyr Gln His Leu Tyr Phe Thr Ala  
275 280 285

Met Leu Pro Met Leu Arg Phe Ser Trp Thr Gly Gln Ser Val Gln Trp  
290 295 300

Val Phe Lys Glu Asn Gln Met Glu Tyr Lys Val Tyr Gln Arg Asn Ala  
305 310 315 320

Phe Trp Glu Gln Ala Thr Ile Val Gly His Trp Ala Trp Val Phe Tyr  
325 330 335

Gln Leu Phe Leu Leu Pro Thr Trp Pro Leu Arg Val Ala Tyr Phe Ile  
340 345 350

Ile Ser Gln Met Gly Gly Gly Leu Leu Ile Ala His Val Val Thr Phe  
355 360 365

Asn His Asn Ser Val Asp Lys Tyr Pro Ala Asn Ser Arg Ile Leu Asn  
370 375 380

Asn Phe Ala Ala Leu Gln Ile Leu Thr Thr Arg Asn Met Thr Pro Ser  
385 390 395 400

Pro Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His  
405 410 415

His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg Cys Asn Leu Asn Ala Cys Met Lys  
420 425 430

Tyr Val Lys Glu Trp Cys Lys Glu Asn Asn Leu Pro Tyr Leu Val Asp  
435 440 445

Asp Tyr Phe Asp Gly Tyr Ala Met Asn Leu Gln Gln Leu Lys Asn Met  
450 455 460

WO 00/00593

28

PCT/DE99/01859

Ala Glu His Ile Gln Ala Lys    Ala Ala  
465                                    470

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 525 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

```

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
1           5           10           15
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
20           25           30
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
35           40           45
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
50           55           60
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
65           70           75           80
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
85           90           95
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
100          105          110
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
115          120          125
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
130          135          140
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
145          150          155          160
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
165          170          175
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
180          185          190
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
195          200          205
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
210          215          220
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
225          230          235          240

```

WO 00/00593

29

PCT/DE99/01859

```

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
      245                      250                      255
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
      260                      265                      270
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
      275                      280                      285
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
      290                      295                      300
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
      305                      310                      315                      320
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
      325                      330                      335
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
      340                      345                      350
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
      355                      360                      365
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
      370                      375                      380
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
      385                      390                      395                      400
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
      405                      410                      415
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
      420                      425                      430
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
      435                      440                      445
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
      450                      455                      460
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
      465                      470                      475                      480
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
      485                      490                      495
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
      500                      505                      510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
      515                      520                      525

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 454 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

WO 00/00593

30

PCT/DE99/01859

.(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

```

Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp
1           5           10           15
Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly
20           25           30
Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe
35           40           45
His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu
50           55           60
Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys
65           70           75           80
Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn
85           90           95
Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu
100          105          110
Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe
115          120          125
Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe
130          135          140
Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly
145          150          155          160
Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His
165          170          175
Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val
180          185          190
Gly Asn Phe Leu Gln Val Ser His Ile Phe Asn Asn Gly Phe Ser Ser
195          200          205
Gly Gly Trp Lys Glu Gln His Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val
210          215          220
Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val
225          230          235          240
Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu
245          250          255
Phe Arg Trp Gln His Val His Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg
260          265          270
Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr
275          280          285
    
```

WO 00/00593

1

PCT/DE99/01859

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Gesellschaft f. Erwerb u. Verwertung  
landwirtschaftlicher Pflanzensorten mbH  
(B) STRASSE: Kaufmannstr. 71  
(C) ORT: Bonn  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 53115

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Sphingolipid-Desaturase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 43

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1594 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 51..1397

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGATTCTGTT AATTTCAAGA TTCTGATTAA AAACCATCTC TGTTTCAACA ATG TCG	56
Met Ser	
1	
GAG CAG ACA AAG AAG AGA TTC ATT ACA AGC GAT GAT CTG AAA AAA CAC	104
Glu Gln Thr Lys Lys Arg Phe Ile Thr Ser Asp Asp Leu Lys Lys His	
5 10 15	
AAC CAA CCC GGA GAT TTA TGG ATC TCA ATC CAA GGC AAA GTC TAC GAC	152
Asn Gln Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Val Tyr Asp	
20 25 30	
GTC TCC CAC TGG GTC AAA TCC CAT CCC GGA GGC GAA GCA GCG ATC CTA	200
Val Ser His Trp Val Lys Ser His Pro Gly Glu Ala Ala Ile Leu	
35 40 45 50	
AAC CTC GCC GGT CAA GAC GTC ACC GAC GCG TTC ATC GCT TAC CAT CCC	248
Asn Leu Ala Gly Gln Asp Val Thr Asp Ala Phe Ile Ala Tyr His Pro	
55 60 65	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**